

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 374**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
A61P 37/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2011 PCT/IB2011/050792**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11104687**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2011 E 11711673 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2539369**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas anti-receptor de IL-7 y procedimientos**

30 Prioridad:

31.01.2011 US 438205 P
24.02.2010 US 307670 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.08.2020

73 Titular/es:

RINAT NEUROSCIENCE CORP. (100.0%)
230 East Grand Avenue
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

LIN, CHIA-YANG;
LEE, LI-FEN y
ZHAI, WENWU

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 780 374 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 antagonistas anti-receptor de IL-7 y procedimientos

Campo

5 La presente invención se refiere a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o partes de unión a antígeno de los mismos, que antagonizan la actividad del receptor de interleucina-7 (IL-7R), incluyendo su interacción con IL-7. La invención se refiere adicionalmente a composiciones que comprenden un antagonista de IL-7R, tal como un anticuerpo antagonista de IL-7 y procedimientos para usar el antagonista de IL-7R como un medicamento. El antagonista de IL-7R puede usarse en la prevención y/o tratamiento de diabetes tipo 2, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) y trastornos autoinmunes, incluyendo diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y lupus.

10 Antecedentes

El complejo de IL-7R es un receptor heterodimérico constituido por la cadena alfa de IL-7R (IL-7R α) y la cadena gamma común (γ c) (Mazzucchelli y col., Nat Rev Immunol., 2007, 7: 144–54). IL-7R se une a interleucina-7 (IL-7), una citocina esencial para el desarrollo y mantenimiento homeostático de los linfocitos T y B (Fry y col., J Immunol., 2005, 174: 6571–6). La unión de IL-7 a IL-7R activa múltiples rutas que regulan la supervivencia de linfocitos, la captación de glucosa, la proliferación y la diferenciación.

15 IL-7R se expresa en células dendríticas y monocitos y parece actuar en múltiples linajes hematopoyéticos (Reche PA, y col., J Immunol., 2001, 167: 336–43). En células dendríticas, IL-7R desempeña un papel inmunomodulador, mientras que los linfocitos requieren señalización de IL-7R para su supervivencia, proliferación y diferenciación. Las rutas Jak-Stat y PI3K-Akt se activan por la unión de IL-7 a IL-7R (Jian y col., Cytokine Growth Factor Rev., 2005, 16: 513-533).
20 Estas rutas implican interferencia de señalización, dominios de interacción compartidos, bucles de retroalimentación, regulación génica integrada, multimerización y competición por ligando. Algunas dianas de la señalización de IL-7, incluyendo Bcl2 y Pyk2 contribuyen a la supervivencia celular. Otras dianas, tales como PI3 quinasa, la familia src de quinasas (lck y fyn) y STAT5, contribuyen a la proliferación celular. El factor de transcripción STAT5 contribuye a la activación de múltiples genes cadena abajo diferentes en linfocitos B y T y puede contribuir a la recombinación de VDJ
25 a través de la alteración de la estructura de la cromatina. Las señales de supervivencia celular y proliferación celular inducidas por IL-7 se combinan para inducir desarrollo de linfocitos T normal. Los detalles de la compleja red de señalización de IL-7 y su interacción con otras cascadas de señalización en células del sistema inmune no se han elucidado completamente. El documento WO10017468 discute los métodos de tratamiento de la esclerosis múltiple que comprenden la neutralización de la actividad biológica de la IL-7 mediante la unión a CD127 o IL-7.

30 A partir de la información disponible en la técnica y antes de la presente invención, no estaba claro si la introducción de un anticuerpo antagonista de IL-7R en la circulación sanguínea para antagonizar de forma selectiva IL-7R sería eficaz para tratar diabetes tipo 2, diabetes tipo 1, GVHD, lupus y artritis reumatoide y, si fuera así, qué propiedades de un anticuerpo para IL-7R se necesitan para dicha eficacia *in vivo*.

Sumario

35 La invención es como se declara en las reivindicaciones.

Se proporcionan anticuerpos antagonistas que interaccionan selectivamente con e inhiben la función de IL-7R. Se demuestra por primera vez que ciertos anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces *in vivo* para tratar diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, artritis reumatoide, GVHD y lupus.

40 En algunas realizaciones, se proporcionan anticuerpos antagonistas que interaccionan selectivamente con e inhiben la función de IL-7R. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a IL-7R y de acuerdo con la divulgación comprende una región de unión a antígenos que compite con un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a y HAL403b, con respecto a la unión con IL-7R. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 42 o SEC ID N°: 43. En otras realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a IL-7R y
45 reconoce un epítipo que solapa con un epítipo de IL-7R que se reconoce por un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a y HAL403b. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un epítipo que comprende los restos I82, K84, K100, T105 y Y192 del receptor de interleucina-7 alfa (IL-7R α). En algunas realizaciones, el epítipo comprende adicionalmente uno o más restos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los restos D190, H191 y K194 de IL-7R α humano.

50 En algunas realizaciones, el IL-7R es IL-7R humano.

En algunas divulgaciones, el anticuerpo se une específicamente al receptor de interleucina-7 α (IL-7R α) y comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos X₁X₂VMH, en la que X₁ es D o N; X₂ es S o Y (SEC ID N°: 50), una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos X₇X₂X₃X₄X₅GX₆X₇TTYADSVKKG, en la que X₁ es L o A; X₂ es V o I; X₃ es G o S; X₄ es W o G; X₅ es D o S; X₆ es F, G o S; X₇ es F, A o S (SEC ID N°: 51), y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de

aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, en la que X_1 es Q o D; X_2 es G o I; X_3 es D o S; X_4 es Y o G; X_5 es M, V o G; X_6 es G o F; X_7 es N, D o M; X_8 es N, Y o D (SEC ID N°: 52), una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos $TX_1SSGX_2IX_3SSYVQ$ en la que X_1 es R o G; X_2 es S o R; X_3 es D o A (SEC ID N°: 53), una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos EDX_1QRPS en la que X_1 es D o N (SEC ID N°: 54) y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos $X_1X_2YX_3X_4X_5X_6LX_7$ en la que X_1 es Q o M; X_2 es S o Q; X_3 es D o A; X_4 es F o S; X_5 es H o S; X_6 es H o S; X_7 es V o W (SEC ID N°: 55), en la que el anticuerpo bloquea la fosforilación de STAT5 en un ensayo de activación de STAT5. En algunas divulgaciones, la reacción flanqueante entre CDR2 de VH y CDR3 de VH comprende la secuencia de aminoácidos alanina-arginina, en la que la arginina está adyacente al primer resto aminoacídico de CDR3 de VH. En algunas realizaciones, la reacción flanqueante entre CDR2 de VH y CDR3 de VH comprende la secuencia de aminoácidos cisteína-alanina-arginina, en la que la arginina está adyacente al primer resto aminoacídico de CDR3 de VH.

En algunas divulgaciones, el anticuerpo comprende una región de contacto con CDR de cadena pesada uno que tiene la secuencia de aminoácidos X_1X_2VMH , en la que X_1 es D o N; X_2 es S o Y (SEC ID N°: 50), una región de contacto con CDR de cadena pesada dos que tiene la secuencia de aminoácidos $GWGDF$ (SEC ID N°: 57) y una región de contacto con CDR de cadena pesada tres que tiene la secuencia de aminoácidos $ARX_1X_2X_3X_4$ (SEC ID N°: 58), una región de contacto de CDR de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos $SGSIDSSY$ (SEC ID N°: 59), una región de contacto de CDR de cadena ligera dos que tiene la secuencia de aminoácidos $EDDQRPSGV$ (SEC ID N°: 60) y una región de contacto de CDR de cadena ligera tres que tiene la secuencia de aminoácidos $FHHL$ (SEC ID N°: 61), en la que el anticuerpo bloquea la fosforilación de STAT5 en un ensayo de activación de STAT5.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a $IL-7R\alpha$ y comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos $DSVMH$ (SEC ID N°: 19), $GFTFDDS$ (SEC ID N°: 46), o $GFTFDDSVMH$ (SEC ID N°: 47), una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos $LVGWGDFFTYADSVKG$ (SEC ID N°: 23) o $GWGDF$ (SEC ID N°: 48) y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos $QGDYMGNN$ (SEC ID N°: 49) o de acuerdo con la divulgación una variante de la misma que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos $TRSSGSIDSSYVQ$ (SEC ID N°: 29), una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos $EDDQRPS$ (SEC ID N°: 31) y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos $QSYDFHHLV$ (SEC ID N°: 36) o de acuerdo a la divulgación una variante de la misma que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende adicionalmente una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 19, 46 o 47, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 23 o 48 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 49 o de acuerdo con la divulgación una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3.

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a $IL-7R\alpha$ y comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 19, 46 o 47, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 23 o 48, y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 49, una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 29, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 31 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 36. En algunas realizaciones, la región VH comprende la secuencia de aminoácidos

$EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLS$ CAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWVSLVGWDFFTYADSVKGRFTISRDN
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWQGTLVTVSS (SEC ID N°: 40) y la región VL comprende la
secuencia de aminoácidos
 $NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI$
 $SGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVL$ (SEC ID N°: 41). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos

$NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI$
 $SGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS$
 $PVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS$ (SEC ID N°: 43) y una
cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos
 $EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLS$ CAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWVSLVGWDFFTYADSVKGRFTISRDN
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVAPELLGGPSVFLFP
PKPKDITLMISRTEPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
DSDGFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 42) con o sin la lisina C-terminal de SEC ID N°: 42.

En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante. En algunas realizaciones, el anticuerpo es de la subclase IgG1 o Ig2Δa humana. En algunas divulgaciones, el anticuerpo comprende una región constante glucosilada. En algunas divulgaciones, el anticuerpo comprende una región constante que tiene una afinidad de unión aumentada por un receptor de Fc gamma humano.

5 En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que interacciona selectivamente con e inhibe la función de IL-7R.

En algunas realizaciones, se proporciona una línea celular que produce de forma recombinante un anticuerpo que interacciona selectivamente con e inhibe la función de IL-7R.

10 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que interacciona selectivamente con e inhibe la función de IL-7R.

En algunas divulgaciones, se proporcionan procedimientos para disminuir los niveles de glucosa en sangre en un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que necesite dicho tratamiento, disminuyendo de este modo los niveles de glucosa en sangre.

15 En algunas divulgaciones, se proporcionan procedimientos para mejorar la tolerancia a la glucosa en un individuo. En algunas divulgaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que necesite dicho tratamiento, mejorando de este modo la tolerancia a la glucosa.

20 En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar diabetes tipo 1 en un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que necesite dicho tratamiento, previniendo o tratando de este modo uno o más síntomas de la diabetes tipo 1.

25 En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar la diabetes tipo 2. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-7R a un individuo que necesite dicho tratamiento, previniendo o tratando de este modo uno o más síntomas de la diabetes tipo 2. En algunas realizaciones, el antagonista de IL-7R es un anticuerpo antagonista de IL-7R.

30 En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar la artritis reumatoide en un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que necesite dicho tratamiento, previniendo o tratando de este modo uno o más síntomas de la artritis reumatoide.

En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que necesite dicho tratamiento, previniendo o tratando de este modo uno o más síntomas de GVHD.

35 En algunas divulgaciones, la GVHD es GVHD crónica o GVHD aguda.

En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar el lupus en un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que necesite dicho tratamiento, previniendo o tratando de este modo uno o más síntomas del lupus.

40 En algunas divulgaciones, el lupus es lupus eritematoso cutáneo, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso o neonatal inducido por fármacos.

45 En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar esclerosis múltiple en un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que necesite dicho tratamiento, previniendo o tratando de este modo uno o más síntomas de esclerosis múltiple y reduciendo y/o agotando las poblaciones de linfocitos T activados y/o vírgenes en el individuo. En algunas realizaciones, las poblaciones de linfocitos T reducidas o agotadas en el individuo comprenden linfocitos T_H1 y/o T_H17. En algunas divulgaciones, la administración del anticuerpo antagonista de IL-7R no da como resultado la expansión de la población de linfocitos T_H17 en el individuo.

50 En algunas divulgaciones, el anticuerpo puede administrarse por vía parenteral. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

Breve Descripción de las Figuras/Dibujos

La Figura 1 representa el efecto dependiente de dosis de los anticuerpos monoclonales antagonistas de IL-7R P2D2, P2E11 y HAL403a en fosforilación de STAT5 mediada por IL-7 en células mononucleares de sangre periférica humana

(PBMC). El eje de las x indica el porcentaje de linfocitos CD4+ que expresan fosfo-STAT5 (p-STAT).

La Figura 2 representa el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en el desarrollo de diabetes en ratones diabéticos no obesos (NOD).

5 La Figura 3 representa el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en (A) niveles de glucosa en sangre (mg/dl) y (B) peso corporal (g) en ratones NOD.

La Figura 4 representa el efecto de un anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en (A) linfocitos T CD8+ vírgenes y (B) linfocitos T CD8+ de memoria en ratones NOD. Para el eje de las x, la población de linfocitos T de CD8+ total se estableció como 100 %.

10 La Figura 5 representa el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en una población de linfocitos T CD4+ vírgenes en ratones NOD. Para el eje de las x, la población de linfocitos T CD4+ total se estableció como 100 %.

15 La Figura 6 representa el efecto de los anticuerpos monoclonales antagonistas de IL-7R 28B6 y 28G9 sobre la gravedad clínica de animales con EAE. La gravedad clínica de EAE se evaluó diariamente con un sistema de puntuación de 0 a 5 puntos: 0, normal; 1, cola flácida; 2, parálisis de extremidades traseras parcial; 3, parálisis de extremidades traseras total; 4, tetraplejia; 5, estado moribundo o muerte.

La Figura 7 representa el efecto dependiente de dosis de un anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 sobre la gravedad clínica de animales con EAE.

La Figura 8 representa el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en la gravedad clínica de animales con EAE.

20 La Figura 9 representa el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en animales con EAE establecida.

La Figura 10 representa el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 a dosis menor en animales con EAE establecida.

25 La Figura 11 representa el efecto de los anticuerpos monoclonales antagonistas de IL-7R 28G9 28B6 en poblaciones de (A) linfocitos T CD4 y (B) linfocitos T CD8 de médula ósea (MO), bazo, sangre y ganglios linfáticos (GL) de animales con EAE. Para el eje de las x la población de linfocitos total se estableció como 100 %.

Las Figuras 12A-C representan el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en poblaciones de (A) linfocitos T vírgenes, (B) linfocitos T de memoria y (C) linfocitos T activados de médula ósea, bazo, sangre y ganglios linfáticos de animales con EAE. Para el eje de las x, a población de linfocitos T CD8+ se estableció como 100 %.

30 La Figura 13 representa el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en poblaciones de linfocitos T_{eff} (gráfico izquierdo) y linfocitos T_{reg} (gráfico derecho) de médula ósea, bazo, sangre y ganglios linfáticos de animales con EAE. Para el eje de las x, la población de linfocitos T CD4+ se estableció como 100 %. “**” indica P<0,05 en comparación con el control.

35 La Figura 14 representa el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) en ratones con obesidad inducida por dieta alta en grasa (DIO).

La Figura 15 representa el efecto del anticuerpo monoclonal antagonista de IL-7R 28G9 en intolerancia a la glucosa en ratones con obesidad inducida por dieta alta en grasa (DIO).

Descripción Detallada

40 Se divulgan en el presente documento anticuerpos que antagonizan la función de IL-7R, incluyendo su interacción con IL-7. Se proporcionan procedimientos para preparar anticuerpos antagonistas de IL-7R, composiciones que comprenden estos anticuerpos y procedimientos para usar estos anticuerpos como un medicamento. Pueden usarse antagonistas de IL-7R, por ejemplo, anticuerpos antagonistas de IL-7R en la prevención y/o tratamiento de diabetes tipo 2, GVHD y trastornos autoinmunes, incluyendo esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, diabetes tipo 1 y lupus.

Técnicas Generales

45 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987);
50 Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture:

Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y col., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan y col., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

10 Definiciones

Un "anticuerpo" es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término abarca no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) y de dominio (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y de camélido) y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de los mismos) y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante o sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el procedimiento de hibridoma descrito primero por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256:495, o pueden prepararse por procedimientos de ADN recombinante tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., 1990, Nature 348:552-554, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, anticuerpo "humanizado" se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Preferentemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor con restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de regiones flanqueantes Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que no se hallan en el anticuerpo receptor ni en las secuencias flanqueantes o CDR importadas, pero se incluyen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos una, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región o dominio constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente el de una inmunoglobulina humana. Se divulgan anticuerpos que tienen las regiones Fc modificadas como se describe en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2 CDR L3, CDR H1, CDR H2 o CDR H3) que se alteran con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo original.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpo humano", significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos conocida por los expertos en la materia o divulgadas en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humano o al menos un polipéptido de cadena ligera humano. Un ejemplo tal es un

anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y de cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia. En una divulgación, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, expresando esa biblioteca de fagos anticuerpos humanos (Vaughan y col, 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets y col, 1998, Proc Natl Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol Biol, 227:381; Marks y col., 1991, J. Mol Biol, 222:581). También pueden prepararse anticuerpos humanos por inmunización de animales en los que se han introducido de forma transgénica loci de inmunoglobulina humana en lugar de los loci endógenos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Este enfoque se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016. Como alternativa, el anticuerpo humano puede prepararse mediante inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77, 1985; Boerner y col, 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; y Patente de Estados Unidos N° 5.750.373.

Como se usa en el presente documento, el término "IL-7R" se refiere a cualquier forma de IL-7R y variantes del mismo que conservan al menos parte de la actividad de IL-7R. A no ser que se indique algo diferente, tal como por referencia específica a IL-7R humano, IL-7R incluye todas las especies de mamífero de IL-7R de secuencia nativa, por ejemplo, humano, canino, felino, equino y bovino.

Como se usa en el presente documento, un "antagonista de IL-7R" se refiere a un anticuerpo o molécula que es capaz de inhibir la actividad biológica de IL-7R y/o una ruta o rutas cadena abajo mediadas por señalización de IL-7R. Incluyendo unión a IL-7, fosforilación de STAT5, Src quinasas, PI3 quinasa y Pyk2 y regulación positiva de proteína Bcl2. Los ejemplos de antagonistas de IL-7R incluyen, sin limitación, anticuerpos antagonistas de IL-7R, ARNip de IL-7R, ARNhp IL-7R y oligonucleótidos antisentido de IL-7R.

Los anticuerpos antagonistas de IL-7R abarcan anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (hasta cualquier grado, incluyendo de forma significativa) la actividad biológica de IL-7R, incluyendo rutas cadena abajo mediadas por señalización de IL-7R, dicha interacción con IL-7 y/o inducción de una respuesta celular a IL-7. Para el fin de la presente divulgación, se entenderá explícitamente que la expresión "anticuerpo antagonista de IL-7R" (denominado de forma intercambiable "anticuerpo antagonista de IL-7R", "anticuerpo anti-IL-7R antagonista" o "anticuerpo antagonista anti-IL-7R") abarca todos las expresiones, títulos y características y estados funcionales anteriormente identificados por lo que el IL-7R en sí mismo, una actividad biológica de IL-7R (incluyendo sin limitación la interacción con IL-7, su capacidad para mediar cualquier aspecto de la fosforilación de STAT5, activación de la ruta de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)-Akt, regulación negativa de p27^{Kip1}, regulación positiva de Bcl-2, hiperfosforilación de Rb y regulación positiva de CXCR4) o las consecuencias de la actividad biológica, sustancialmente se anulan, disminuyen o neutralizan en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista de IL-7R se une IL-7R y evita la interacción con IL-7. Se proporcionan ejemplos de anticuerpos antagonistas de IL-7R en el presente documento.

Como se usa en el presente documento "un antagonista completo" es un antagonista que, a una concentración eficaz, esencialmente bloquea completamente un efecto medible de IL-7R. Por un antagonista parcial se entiende un antagonista que es capaz de bloquear parcialmente un efecto medible, pero que, incluso a una concentración mayor no es un antagonista completo. Por esencialmente completamente se entiende que al menos aproximadamente el 80 %, preferentemente, al menos aproximadamente el 90 %, más preferentemente, al menos aproximadamente el 95 % y más preferentemente, al menos aproximadamente el 98 % del efecto medible se bloquea.

Los términos "polipéptido", "oligopéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a las cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, preferentemente, relativamente cortas (por ejemplo, 10-100 aminoácidos). La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede interrumpirse por no aminoácidos. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente marcador. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos pueden aparecer como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

Como se conoce en la técnica, "polinucleótido", o "ácido nucleico", como se usan de forma intercambiable en el presente documento, se refieren a cadenas de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en una cadena por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, puede ejercerse una modificación a la estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje de la cadena. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como por conjugación con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "extremos protectores", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, las de enlaces sin carga (por

ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y enlaces con carga (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), las que contienen restos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), las que tienen intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), las que tienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), las que contienen alquilantes, las que tienen enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo presentes habitualmente en los azúcares pueden reemplazarse, por ejemplo, con grupos fosfonatos, grupos fosfato, protegerse por grupos de protección convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales con nucleótidos adicionales o pueden conjugarse con soportes sólidos. El OH 5' y 3' terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupo protector orgánico de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos pueden contener también formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa o beta-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas, o xilosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como ribósido de metilo. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden reemplazarse con grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza con P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contienen opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos indicados en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación. Como se conoce en la técnica, las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones flanqueantes (FR) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad cercana por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar CDR: (1) un enfoque basado en variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat y col Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª edición, 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos de antígeno-anticuerpo (Al-lazikani y col, 1997, J. Molec Biol. 273:927-948). Como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a las CDR definidas por cualquiera de ambos enfoques o por una combinación de ambos enfoques.

Como se conoce en la técnica una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera de anticuerpo o la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, sola o en combinación.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo "interacciona con" IL-7R cuando la constante de disociación en equilibrio es igual a o menor de 20 nM, preferentemente menor de aproximadamente 6 nM, más preferentemente menor de aproximadamente 1 nM, más preferentemente menor de aproximadamente 0,2 nM, como se mide por los procedimientos divulgados en el presente documento en el Ejemplo 2.

Un epítipo que "se une preferentemente" o "se une específicamente" (usadas de forma intercambiable en el presente documento) a un anticuerpo o un polipéptido es una expresión bien entendida en la técnica, y los procedimientos para determinar dicha unión específica o preferencial también se conocen bien en la técnica. Una molécula se dice que muestra "unión específica" o "unión preferente" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" con una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con una mayor duración que cuando se une con otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferentemente a un epítipo de IL-7R es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con una mayor duración que cuando se une a otros epítipos de IL-7R o epítipos que no son de IL-7R. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específicamente o preferentemente a una primera diana puede o no unirse específicamente o preferentemente a una segunda diana. Como tal, "unión específica" o "unión preferente" no requiere necesariamente (aunque pueden incluir) unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferente.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" se refiere a material que es al menos 50 % puro (es decir, sin contaminantes), más preferentemente al menos 90 % puro, más preferentemente, al menos 95 % puro, aún más preferentemente, al menos 98 % puro, y más preferentemente, al menos 99 % puro.

Una "célula huésped" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de vector o vectores para la incorporación de insertos de polinucleótido. Las células huésped incluyen descendientes de una célula huésped sencilla y la descendencia puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula parental original debido a mutación natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas *in vivo* con un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención.

Como se conoce en la técnica, la expresión “región Fc” se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina. La “región Fc” puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define que se extiende desde un resto aminoacídico en la posición Cys226, o de Pro230, al extremo carboxilo terminal de la misma. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. La región Fc de una inmunoglobulina generalmente comprende dos regiones constantes, CH2 y CH3.

Como uso en la técnica, “receptor de Fc” y “FcR” describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas de estos receptores cortadas y empalmadas de forma alternativa. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor de inhibición”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel y col., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; y de Haas y col., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41. “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; y Kim y col., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

El término “competir” como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o una parte de unión a antígeno de mismo, se une a un epítipo de un modo suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, de modo que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo afín disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo a su epítipo disminuye también de forma detectable en presencia del primer anticuerpo puede, pero no necesita, ser el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo con su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo con su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando afín, en igual, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos “compiten de forma cruzada” entre sí por la unión de su epítipo o epítopos respectivos. Los anticuerpos que compiten y que compiten de forma cruzada están abarcados por la presente invención. Independientemente del organismo por el que suceda dicha competición o competición cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común o parte del mismo), el experto en la materia apreciará, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que dichos anticuerpos que compiten y/o compiten de forma cruzada están abarcados y pueden ser útiles para los procedimientos develados en el presente documento.

Una “región Fc funcional” posee al menos una función efectora de una región Fc de secuencia nativa. Los ejemplos de “funciones efectoras” incluyen unión de C1q; toxicidad dependiente de complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad medida por células dependiente de anticuerpo; fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B), etc. Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región FC se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y puede evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpo.

Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácido, pero mantiene al menos una función efectora de la región Fc de secuencia nativa. En algunas divulgaciones, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos y preferentemente, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región de Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental y más preferentemente, al menos aproximadamente el 90 % de identidad de secuencia con la misma, más preferentemente, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de identidad de secuencia con la misma.

Como se usa en el presente documento “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de la presente divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin limitación, uno o más de los siguientes: potenciación de aclaramiento de glucosa, disminución de los niveles de glucosa en sangre, mejora de la tolerancia a la glucosa, reducción de la incidencia de niveles de glucosa en sangre altos resultantes de diabetes de tipo 1 o tipo 2, reducción de la incidencia o mejora de uno o más síntomas de la artritis reumatoide, reducción de la incidencia o mejora de uno o más síntomas de GVHD, reducción de la incidencia o mejora de uno o más síntomas del lupus, y reducción de la incidencia o mejora de uno o más síntomas de la esclerosis múltiple.

“Reducción de la incidencia” significa cualquiera de reducción de gravedad (que puede incluir reducción de la necesidad de y/o cantidad de (por ejemplo, exposición a) otros fármacos y/o terapias generalmente usadas para esta

afección. Como entienden los expertos en la materia, los individuos pueden variar en términos de su respuesta al tratamiento y, como tal, por ejemplo, un “procedimiento para reducir la incidencia” refleja administrar el antagonista de IL-7R basándose en una expectativa razonable de que dicha administración causará probablemente tal reducción en la incidencia en ese individuo particular.

- 5 “Alivio” significa una disminución o mejora de uno o más síntomas en comparación con no administrar un antagonista de IL-7R. “Alivio” también incluye reducción o acortamiento en la duración de un síntoma.

10 Como se usa en el presente documento, una “dosificación eficaz” o “cantidad eficaz” de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar uno o más resultados beneficiosos o deseados cualesquiera. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados, incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retardar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. Para su uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como reducir niveles de glucosa en sangre, reducir la incidencia o mejora de uno o más síntomas de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, artritis reumatoide, GVHD, lupus o esclerosis múltiple, disminuir la dosis de otras medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, mejorar el efecto de otra medicación y/o retardar la progresión de la enfermedad de los pacientes. Una dosificación eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los propósitos de la presente invención, una dosificación eficaz del fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para conseguir tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no conseguirse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. De este modo, una “dosificación eficaz” puede considerarse en el contexto de administrar uno o más agentes terapéuticos y puede considerarse suministrar un agente sencillo en una cantidad eficaz si junto uno o más agentes adicionales, puede alcanzarse o se alcanza un resultado deseable.

25 Un “individuo” o un “sujeto” es un mamífero, más preferentemente, un ser humano. Los mamíferos también incluyen, sin limitación, animales de granja, animales deportivos, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

30 Como se usa en el presente documento, “vector” significa una construcción, que es capaz de suministrar y, preferentemente, expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de vectores incluyen, sin limitación, vectores virales, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, plásmidos, cósmidos o vectores de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

Como se usa en el presente documento, “secuencia del control de la expresión” significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Una secuencia de control de la expresión puede ser un promotor, tal como un promotor constitutivo o inducible, o un potenciador. La secuencia de control de la expresión está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico a transcribir.

35 Como se usa en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material que, cuando se combina con un principio activo, permite al ingrediente conservar actividad biológica y no es reactivo con el sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen, sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales tales como solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para aerosol o administración parenteral son solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina normal (0,9 %). Las composiciones que comprenden tales vehículos se formulan por procedimientos bien conocidos convencionales (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing, 2000).

45 El término “ k_{on} ”, como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad para la asociación de un antígeno con un anticuerpo. Específicamente, las constantes de velocidad (K_{on} y K_{off}) y las constantes de disociación en equilibrio se miden usando fragmentos Fab de anticuerpos (es decir univalentes) e IL-7R.

El término “ K_{off} ”, como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad para la disociación de un anticuerpo del complejo antígeno/anticuerpo.

50 El término “ K_D ”, como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo/antígeno

La referencia a “aproximadamente” un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se dirigen a ese valor o parámetro por sí mismo. Por ejemplo, una descripción que se refiere a “aproximadamente X” incluye la descripción de “X”. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo.

55 Se entiende que siempre que se describen realizaciones en el presente documento con el lenguaje “que comprende”, también se proporcionan realizaciones análogas de otro modo descritas en términos de “consiste en” y/o “consiste esencialmente en”.

5 Cuando se describen aspectos o realizaciones de la invención en términos de un grupo de Markush u otro agrupamiento de alternativas, la presente divulgación abarca no solo el grupo entero enumerado en su conjunto, sino cada miembro del grupo individualmente y todos los posibles subgrupos del grupo principal, pero también el grupo principal sin uno o más de los miembros del grupo. La presente divulgación también prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

10 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tiene el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que esta invención pertenece. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, tendrá prioridad. A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, la palabra “comprender” o variaciones como “comprende” o “comprendiendo” se entiende que implican la inclusión de un número entero o grupos de enteros indicados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. A no ser que se requiera de otro modo por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y términos plurales incluirán el singular.

15 Se describen procedimientos y materiales ejemplares en el presente documento, aunque también pueden usarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación. Los materiales, procedimientos y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

Procedimientos para prevenir o tratar la diabetes de tipo 2, GVHD y trastornos autoinmunes

20 En una divulgación, la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir diabetes de tipo 2 en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de IL-7R tal como, por ejemplo, de acuerdo con la divulgación un anticuerpo antagonista de IL-7R. En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad autoinmune, tal como, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide, lupus o esclerosis múltiple, en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de IL-7R. En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir GVHD en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de IL-7R.

25 En algunas divulgaciones, la administración terapéutica del antagonista de IL-7R resulta ventajosamente en un nivel de glucosa en sangre más bajo y tolerancia a la glucosa mejorada. En otras divulgaciones, la administración terapéutica del antagonista de IL-7R ventajosamente mantiene la glucosa en sangre a niveles deseados.

30 En algunas divulgaciones, la administración terapéutica del antagonista de IL-7R ventajosamente da como resultado una incidencia reducida y/o mejora de uno o más síntomas de artritis reumatoide incluyendo, por ejemplo, sin limitación, agarrotamiento en las articulaciones, hinchazón de articulaciones, dolor de las articulaciones y rojez y calor en las articulaciones.

35 En algunas divulgaciones, la administración terapéutica del antagonista de IL-7R da como resultado ventajosamente una incidencia reducida y/o mejora de uno o más síntomas del lupus incluyendo, por ejemplo, sin limitación, fatiga, fiebre, pérdida de peso, ganancia de peso, dolor de las articulaciones, agarrotamiento de las articulaciones, hinchazón de las articulaciones, erupción malar, lesiones cutáneas, úlceras bucales, úlceras nasales, alopecia, fenómeno de Raynaud, disnea, dolor en el pecho, sequedad en los ojos, magulladuras, ansiedad, depresión y pérdida de memoria.

40 En algunas divulgaciones, la administración terapéutica del antagonista de IL-7R da como resultado de forma ventajosa una incidencia reducida y/o mejora de uno o más síntomas de esclerosis múltiple incluyendo, por ejemplo sin limitación, parálisis de las extremidades, temblores, dificultad al caminar, dificultad al tragar, ceguera, visión borrosa y debilidad muscular.

En algunas divulgaciones, la administración farmacéutica del antagonista de IL-7R da como resultado ventajosamente una incidencia reducida y/o mejora de uno o más síntomas de GVHD incluyendo, por ejemplo sin limitación, dolor abdominal, calambres, fiebre, ictericia, erupción cutánea, emesis, pérdida de peso, sequedad en los ojos, sequedad en la boca, pérdida de cabello, hepatitis, trastornos pulmonares y trastornos del tracto digestivo.

45 En algunas divulgaciones, la administración terapéutica del antagonista de IL-7R da como resultado de forma ventajosa una incidencia reducida y/o mejora de uno o más síntomas de GVHD aguda incluyendo, por ejemplo sin limitación, neumonitis, inflamación intestinal, diarrea, dolor abdominal, calambres abdominales, fiebre, ictericia, náusea, emesis, daño hepático, erupción cutánea, daño cutáneo, daño de la mucosa, desprendimiento de la membrana mucosa, daño al tracto gastrointestinal, pérdida de peso, erupción maculopapular, niveles de bilirrubina elevados, morbilidad y mortalidad.

50 En algunas divulgaciones, la administración terapéutica del antagonista de IL-7R da como resultado de forma ventajosa una incidencia reducida y/o mejora de uno o más síntomas de GVHD crónica incluyendo, por ejemplo sin limitación, ojos secos, boca seca, alopecia, hepatitis, trastornos del pulmón, trastornos del tracto digestivo, erupción cutánea, úlcera oral, atrofia oral, oncodistrofia, síndrome de sicca, esclerosis, lesiones de tipo liquen plano, poiquiloderma, redes esofágicas, fascitis y bronquiolitis obliterans, y daño al hígado, piel y mucosas, tejido conectivo, glándulas exocrinas y/o el tracto gastrointestinal.

5 De acuerdo con la invención, un individuo diabético que requiere niveles de glucosa en sangre más bajos puede tratarse con un antagonista de IL-7R tal como, por ejemplo, de acuerdo con la invención un anticuerpo antagonista de IL-7R. Un individuo adecuado para terapia con anticuerpos se selecciona usando criterios clínicos e indicadores de pronóstico de diabetes que se conocen bien en la técnica. Un individuo en riesgo de desarrollar diabetes según se evalúa por indicadores de pronóstico conocidos tales como historia familiar, niveles de glucosa en sangre en ayunas o tolerancia a la glucosa disminuida también requiere la administración de un antagonista de IL-7R. Un experto en la materia reconocerá o sabrá cómo diagnosticar un individuo con diabetes o captación de glucosa desregulada y, dependiendo del grado o gravedad de la enfermedad, puede realizar la determinación apropiada de cuándo administrar el anticuerpo y también seleccionar el modo más deseable de administración.

10 De acuerdo con la divulgación, un individuo que padece artritis reumatoide puede tratarse con un antagonista de IL-7R, tal como, por ejemplo, de acuerdo con la invención un anticuerpo antagonista de IL-7R. Un individuo adecuado para terapia con antagonista de IL-7R se selecciona usando criterios clínicos e indicadores de pronóstico de artritis reumatoide que se conocen bien en la técnica. El diagnóstico o evaluación de la artritis reumatoide está bien establecido en la técnica. La evaluación de la gravedad puede realizarse basándose en medidas conocidas en la técnica, tales como escala de gravedad de artritis reumatoide (RASS). Bardwell y col., *Rheumatology*, 2002, 41:38-45. En algunas realizaciones, la mejora, control, reducción de la incidencia o retardo del desarrollo o progresión de la artritis reumatoide y/o síntomas de artritis reumatoide se miden por RASS.

20 De acuerdo con la divulgación, un individuo que padece lupus puede tratarse con un antagonista de IL-7R tal como, por ejemplo, de acuerdo con la invención un anticuerpo antagonista de IL-7R. Un individuo adecuado para terapia con antagonista de IL-7R se selecciona usando criterios clínicos e indicadores de pronóstico de lupus que se conocen bien en la técnica. Un experto en la materia reconocerá o sabrá cómo diagnosticar a un individuo con lupus y, dependiendo del grado o gravedad de la enfermedad, puede realizar la determinación apropiada de cuando administrar el antagonista de IL-7R y también seleccionar el modo de administración más deseable.

25 De acuerdo con la divulgación, un individuo que padece esclerosis múltiple puede tratarse con un antagonista de IL-7R tal como, por ejemplo, de acuerdo con la divulgación, un anticuerpo antagonista de IL-7R. Un individuo adecuado para terapia con antagonista de IL-7R se selecciona usando criterios clínicos e indicadores de pronóstico de esclerosis múltiple que se conocen bien en la técnica. Un individuo en riesgo de desarrollar esclerosis múltiple según se evalúa por indicadores de pronóstico conocidos tales como historia familiar o historia sintomática también justifica la administración de un antagonista de IL-7R. Un experto en la materia reconocerá o sabrá cómo diagnosticar a un individuo con esclerosis múltiple y, dependiendo del grado o gravedad de la enfermedad, puede realizar la determinación apropiada de cuando administrar el antagonista de IL-7R y también puede seleccionar el modo de administración más deseable.

35 De acuerdo con la divulgación, un individuo que padece GVHD puede tratarse con una antagonista de IL-7R tal como, por ejemplo, de acuerdo con la divulgación, un anticuerpo antagonista de IL-7R. Un individuo adecuado para terapia con antagonista de IL-7R se selecciona usando criterios clínicos e indicadores de pronóstico de GVHD que se conocen bien en la técnica. El diagnóstico o evaluación de GVHD está bien establecido en la técnica. Los ensayos para GVHD habitualmente dependen de los síntomas, pero pueden incluir endoscopia gastrointestinal, con o sin una biopsia, ensayos de las funciones hepáticas (aumentarán los niveles de AST, ALP y bilirrubina), biopsia del hígado, rayos X de los pulmones y/o biopsia cutánea. Los elementos suficientes para establecer el diagnóstico de GVHD crónica incluyen, por ejemplo, sin limitación, esclerosis, lesiones de tipo líquen plano, poiquiloderma, redes esofágicas, fascitis y bronqueolitis obliterans (véase, por ejemplo, Leet y Flowers, *Hematology*, enero de 2008; 2008:134-141). Puede medirse GVHD aguda de hígado mediante, por ejemplo, el nivel de bilirrubina en pacientes con enfermedad aguda. La GVHD cutánea aguda puede dar como resultado una erupción maculopapular difusa. La evaluación de la gravedad de GVHD puede realizarse basándose en medidas conocidas en la técnica. En algunas divulgaciones, la mejora, control, reducción de la incidencia de o retardo del desarrollo o progresión de GVHD y/o síntomas de GVHD se miden por el grado global (piel-hígado-intestino) con cada órgano evaluado individualmente desde un mínimo de 1 a un máximo de 4. En algunas realizaciones, la mejora, control, reducción de la incidencia o retardo del desarrollo o progresión de GVHD y/o síntomas de GVHD se miden mediante control de peso corporal.

50 Con respecto a todos los procedimientos descritos en el presente documento, la referencia a antagonistas de IL-7R también incluye composiciones que comprenden uno o más agentes adicionales. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que se conocen bien en la técnica. La presente divulgación puede usarse sola o en combinación con otros procedimientos convencionales de tratamiento.

55 El antagonista de IL-7R puede administrarse a un individuo mediante cualquier vía adecuada. Debería resultar evidente para un experto en la materia que los ejemplos descritos en el presente documento no pretenden ser limitantes sino ilustrativos de las técnicas disponibles. En consecuencia, en algunas divulgaciones, el antagonista de IL-7R se administra a un individuo de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, sublingual, intrasnovial, mediante insuflación, intratecal, oral, por inhalación o tópicas. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa o localizada. Los nebulizadores disponibles en el mercado para formulaciones líquidas,

incluyendo nebulizadores a chorro y nebulizadores ultrasónicos son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas pueden nebulizarse directamente y puede nebulizarse polvo liofilizado después de la reconstitución. Como alternativa, un antagonista de IL-7R puede formarse en aerosol usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

5 En una divulgación un antagonista de IL-7R se administra mediante técnicas de suministro específico de sitio o local dirigido. Los ejemplos de técnicas de suministro específico de sitio o local dirigido incluyen diversas fuentes de depósito implantable del antagonista de IL-7R o catéteres de suministro local, tales como catéteres de infusión, catéteres permanentes o catéteres de aguja, injertos sintéticos, vendajes adventicios, shunt y endoprótesis vasculares u otros dispositivos implantables, vehículos específicos de sitio, inyección directa o aplicación directa. Véase, por ejemplo, la
10 Publicación de PCT N° WO 00/53211 y la Patente de Estados Unidos N° 5.981.568.

Diversas formulaciones de un antagonista de IL-7R pueden usarse para administración. En algunas divulgaciones, el antagonista de IL-7R puede administrarse puro. En algunas divulgaciones, el antagonista de IL-7R y un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden estar en diversas formulaciones. Se conocen excipientes farmacéuticamente
15 aceptables en la técnica y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede proporcionar forma o consistencia o actuar como un diluyente. Los excipientes adecuados incluyen sin limitación agentes estabilizantes, humectantes y agentes emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, tampones y potenciadores de la penetración cutánea. Se exponen excipientes así como formulaciones para suministro de fármacos parenteral y no parenteral en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing, 2000.

20 En algunas divulgaciones, estos agentes se formulan para administración por inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía subcutánea, vía intramuscular, etc.). En consecuencia, estos agentes pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, dosis, temporización y repetición, dependerá del individuo particular y la historia médica de ese individuo.

25 Un antagonista de IL-7R puede administrarse usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo por inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía subcutánea, vía intramuscular, etc.). Los anticuerpos de IL-7R también pueden administrarse mediante inhalación, como se describe en el presente documento. Generalmente, para la administración de los anticuerpos de IL-7R, una dosificación de candidato inicial puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. Para el propósito de la presente invención, una dosificación diaria típica podría variar de
30 aproximadamente cualquiera de 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede usarse una dosificación de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento se prolonga hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas o hasta que se consiguen niveles terapéuticos suficientes, por ejemplo, para reducir los niveles de glucosa en sangre. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo de IL-7R o seguido de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles dependiendo del patrón de desintegración farmacocinética que el facultativo desea conseguir. Por
40 ejemplo, en algunas divulgaciones, se contempla la dosificación de una a cuatro veces por semana. En otras divulgaciones, se contempla la dosificación una vez al mes o una vez cada dos meses o cada tres meses. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el antagonista o los antagonistas de IL-7R usados) puede variar a lo largo del tiempo.

45 Para el propósito de la presente divulgación, la dosificación apropiada de un antagonista de IL-7R dependerá del antagonista de IL-7R (o composiciones del mismo) empleado, el tipo y gravedad de síntomas a tratar, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente, la velocidad de aclaramiento del paciente para el agente administrado y la discreción del médico a cargo del caso. Típicamente el especialista clínico administrará un antagonista de IL-7R hasta que se alcanza una dosificación que consigue el resultado deseado. La dosis y/o frecuencia pueden variar durante el transcurso del tratamiento. Las
50 consideraciones empíricas, tales como la semivida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, anticuerpos que son compatibles con el sistema inmune humano, tales como anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, pueden usarse para prolongar la semivida del anticuerpo y para evitar que el anticuerpo se vea atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración puede determinarse o ajustarse a lo largo del transcurso de la terapia y generalmente, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento, supresión, mejora y/o retardo de los síntomas, por ejemplo, niveles de glucosa en sangre altos, dolor de las articulaciones, etc. Como alternativa, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua prolongada de anticuerpos antagonistas de IL-7R. Se conocen diversas formulaciones y dispositivos para conseguir liberación prolongada en la técnica.

55 En una divulgación, pueden determinarse dosificaciones para un antagonista de IL-7R empíricamente en individuos que han recibido una o más administraciones de un antagonista de IL-7R. Se administran dosificaciones crecientes a los individuos de un antagonista de IL-7R. Para evaluar la eficacia, puede seguirse un indicador de la enfermedad.

La administración de un antagonista de IL-7R de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, si el fin de la administración es terapéutico o profiláctico y otros factores conocidos para los facultativos experimentados. La administración de un antagonista de IL-7R puede ser esencialmente continua a lo largo de un periodo de tiempo preseleccionado o puede estar en una serie de dosis espaciadas.

En algunas divulgaciones, puede estar presente más de un antagonista de IL-7R. Al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más antagonistas diferentes de IL-7R pueden estar presentes. Generalmente, esos antagonistas de IL-7R pueden tener actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, uno o más de los siguientes antagonistas de IL-7R pueden usarse: un anticuerpo antagonista de IL-7R, una molécula antisentido dirigida a un IL-7R (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica IL-7R), un compuesto inhibidor de IL-7R y un análogo estructural de IL-7R. Un antagonista de IL-7R también puede usarse junto con otros agentes que sirven para mejorar y/o complementar la eficacia de los agentes.

Las formulaciones terapéuticas del antagonista de IL-7R usadas de acuerdo con la presente divulgación se preparan para almacenamiento mediante mezcla de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing, 2000), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro sódico; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol fenólico, butílico o bencilico; parabenos de alquilo, tales como parabeno de metilo o de propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los liposomas que contienen el antagonista de IL-7R se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688, 1985; Hwang, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030, 1980; y las Patentes de Estados Unidos Nº 4.485.045 y 4.544.545. Se divulgan liposomas con tiempo de circulación mejorado en la Patente de Estados Unidos Nº 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extraen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización de interfase, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing, 2000.

Pueden prepararse preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos modelados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, acetato de vinilo-etileno no degradable, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico.

Las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones de antagonista de IL-7R terapéuticas generalmente se sitúan en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón que puede atravesarse mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones de acuerdo con la siguiente divulgación pueden estar en formas farmacéuticas unitarias tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones o supositorios, para administración oral, parenteral o rectal o administración mediante inhalación o insuflación.

Para la preparación de composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico, por ejemplo ingredientes de formación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas y otros

diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se denominan estas composiciones de preformulación como homogéneas, significa que el principio activo se dispersa uniformemente por toda la composición de modo que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas farmacéuticas unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide después en formas farmacéuticas unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de 0,1 a aproximadamente 500 mg del principio activo de la presente invención. Los comprimidos o píldoras de la nueva composición pueden revestirse o formar compuestos de otro modo para proporcionar una forma farmacéutica que proporciona la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente farmacéutico interno y uno farmacéutico externo, estando el segundo en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente externo pase intacto al duodeno o que se retarde en su liberación. Puede usarse una diversidad de materiales para tales capas o revestimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular agentes no iónicos, tales como polioxietilensorbitanos (por ejemplo, Tween™ 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanos (por ejemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo comprenderán convenientemente entre 0,05 y 5 % de agente tensioactivo y puede estar entre el 0,1 y 2,5 %. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo, manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si fuera necesario.

Las emulsiones adecuadas pueden prepararse usando emulsiones grasas disponibles en el mercado, tales como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El principio activo puede disolverse en una composición de emulsión premezclada o como alternativa puede disolverse en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cárcamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendra) y formarse una emulsión tras la mezcla con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas contendrán típicamente hasta el 20 % de aceite, por ejemplo, entre el 5 y el 20 %. La emulsión grasa puede comprender gotas de grasa entre 0,1 y 1,0 µm, particularmente 0,1 y 0,5 µm y tener un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

Las composiciones de emulsión pueden ser las preparadas mediante la mezcla de un antagonista de IL-7R con Intralipid™ o los componentes del mismo (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables o mezclas de los mismos y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha expuesto anteriormente. En algunas divulgaciones, las composiciones se administran por la vía respiratoria, oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferentemente estériles pueden nebulizarse mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente del dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede unirse a una máscara facial, tienda o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en solución, suspensión o polvo, preferentemente por vía oral o nasal a partir de dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

Antagonistas de IL-7R

Los procedimientos de la divulgación usan un antagonista de IL-7R, que se refiere a cualquier proteína, péptido o molécula de ácido nucleico que bloquea, suprime o reduce (incluyendo reducir significativamente) la actividad biológica de IL-7R incluyendo rutas cadena abajo mediadas por señalización de IL-7R, tal como inducción de una respuesta celular a IL-7R. Los ejemplos de antagonistas de IL-7R incluyen, sin limitación, anticuerpos antagonistas de IL-7R, ARNip de IL-7R, ARNhp de IL-7R y oligonucleótidos antisentido de IL-7R.

Un antagonista de IL-7R debería mostrar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unión a IL-7R; (b) bloqueo de la interacción de IL-7R con IL-7; (c) bloqueo o disminución de fosforilación de STAT5 mediada por IL-7; (d) disminución de los niveles de glucosa en sangre *in vivo*; (e) aumento de la tolerancia a glucosa *in vivo*; (f) reducción de la gravedad de la enfermedad en encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE); (g) bloqueo o disminución de la fosforilación de P13K; (h) bloqueo o disminución de la fosforilación de AKT; y (i) bloqueo de la interacción de IL-7R con otros factores aún por identificar.

En algunas divulgaciones, el antagonista de IL-7R es un anticuerpo antagonista de IL-7R. Para los fines de la presente invención, el anticuerpo antagonista de IL-7R preferentemente reacciona con IL-7Rα de una manera que inhibe la función de señalización de IL-7R y la interacción con IL-7. En algunas divulgaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R reconoce específicamente IL-7R de primate. En algunas divulgaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R se une a IL-7R de primate y roedor.

Los anticuerpos útiles en la presente divulgación pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales,

fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio), anticuerpos humanizados y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glucosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados de forma covalente. Los anticuerpos pueden ser de origen murino, de rata, humano o cualquier otro (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados).

En algunas divulgaciones el anticuerpo antagonista de IL-7R es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo antagonista de IL-7R también puede estar humanizado. En otras divulgaciones, el anticuerpo es humano.

En algunas divulgaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como, por ejemplo, sin limitación, una región constante que tiene potencial mejorado para provocar una respuesta inmune. Por ejemplo, la región constante puede modificarse para tener una afinidad aumentada por un receptor Fc gamma tal como, por ejemplo, Fc γ RI o Fc γ RIIA.

En algunas divulgaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, es decir, que tiene un potencial reducido para provocar una respuesta inmune. En algunas divulgaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624; solicitud de PCT N° PCT/GB99/01441; y/o solicitud de Patente de Reino Unido N° 9809951.8. El Fc puede ser IgG1 humano, IgG2 humano o IgG4 humano. El Fc puede ser IgG2 humano que contiene la mutación A330P331 a S330S331 (IgG2 Δ a), en la que los restos aminoacídicos se enumeran con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo silvestre. Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624. En algunas divulgaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG₄ que comprende las siguientes mutaciones (Armour y col., 2003, Molecular Immunology 40 585-593): E233F234L235 a P233V234A235 (IgG4 Δ c), en la que la numeración está en referencia a IgG4 de tipo silvestre. En otra divulgación más, la Fc es IgG4 humana E233F234L235 a P233V234A235 con delección en G236 (IgG4 Δ b). En otra divulgación la Fc es cualquier Fc de IgG4 humana (IgG4, IgG4 Δ b o IgG4 Δ c) que contiene una mutación bisagra estabilizante S228 a P228 (Aalberse y col., 2002, Immunology 105, 9-19). En otra divulgación, la Fc puede ser Fc aglucosilada.

En algunas divulgaciones, la reacción constante está aglucosilada por la mutación del resto de unión a oligosacárido (tal como Asn297) y/o restos flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de glucosilación en la región constante. En algunas divulgaciones, la región constante está aglucosilada para glucosilación unida a N enzimáticamente. La región constante puede estar aglucosilada para glucosilación unida a N-enzimáticamente o por expresión en una célula huésped deficiente en glucosilación.

La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo antagonista de IL-7R a IL-7R (tal como IL-7R humano) puede ser de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 200 nM. En algunas divulgaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM o aproximadamente 2 pM. En algunas divulgaciones, la afinidad de unión es menor de cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM, o aproximadamente 2 pM.

Un modo de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos con IL-7R es mediante la medición de la afinidad de unión de los fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede escindirse con papaína o expresarse de forma recombinante. La afinidad de un fragmento Fab de IL-7R de un anticuerpo puede determinarse por resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore™3000™, Biacore™, INC, Piscataway NJ) equipada con microplacas sensoras de estreptavidina preinmovilizada (SA) usando tampón de ejecución HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, P20 tensioactivo al 0,005 % v/v). Puede diluirse IL-7R humano biotinilado (o cualquier otro IL-7R) en tampón HBS-EP hasta una concentración de menos de 0,5 μ g/ml e inyectarse a lo largo de los canales de la microplaca individuales usando tiempos de contacto variables, para conseguir dos intervalos de densidad de antígeno, 50-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados o 800-1.000 UR para ensayos de exploración. Los estudios de regeneración han mostrado que NaOH 25 mM en etanol al 25 % v/v retira de forma eficaz el Fab unido mientras que mantiene la actividad de IL-7R en la microplaca durante más de 200 inyecciones. Típicamente, se inyectan diluciones en serie (que abarcan concentraciones de 0,1-10x de K_D estimada) de muestras de Fab purificadas durante 1 minuto a 100 μ l/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan mediante ELISA y/o electroforesis de SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (como se determina mediante análisis de aminoácidos) como un patrón. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) cinéticas se obtienen simultáneamente mediante el ajuste de los datos globalmente a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación en equilibrio

(K_D) se calculan como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para su uso en la determinación de la afinidad de unión de un anticuerpo con cualquier IL-7R, incluyendo IL-7R humano e IL-7R de otro mamífero (tal como IL-7R de ratón, IL-7R de rata, IL-7R de primate) así como diferentes formas de IL-7R. La afinidad de unión de un anticuerpo generalmente se mide a 25 °C, pero también puede medirse a 37 °C.

5 Los anticuerpos antagonistas de IL-7R pueden prepararse por cualquier procedimiento conocido en la técnica incluyendo el procedimiento que se proporciona en el Ejemplo 1. Para la producción de líneas celulares de hibridoma, la vía y programa de inmunización del animal huésped generalmente son coherentes con técnicas establecidas convencionales para la estimulación y producción de anticuerpos, como se describe adicionalmente en el presente documento. Las técnicas generales para producción de anticuerpos humanos y de ratón se conocen en la materia y/o se describen en el presente documento.

10 Se contempla que cualquier sujeto mamífero incluyendo seres humanos o células productoras de anticuerpos de los mismos pueden manipularse para servir como base para la producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero incluyendo de seres humanos. Típicamente, se inocula al animal huésped por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en el presente documento.

15 Pueden prepararse hibridomas a partir de células de mieloma inmortalizadas y de linfocitos usando la técnica de hibridación de células somáticas general de Kohler, B. y Milstein, C., 1975, Nature 256:495-497 o como se modificó por Buck, D. W., y col., In Vitro, 18:377-381, 1982. Pueden usarse en la hibridación líneas de mieloma disponibles, incluyendo sin limitación X63-Ag8.653 y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., Estados Unidos. Generalmente, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides usando un fusógeno tal como polietilenglicol o por medios eléctricos bien conocidos para los expertos en la materia. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar las células parentales no hibridadas. Cualquiera de los medios descritos en el presente documento complementados con o sin suero, pueden usarse para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, pueden usarse linfocitos B inmortalizados EBV para producir los anticuerpos monoclonales de IL-7R de la presente invención. Los hibridomas se expanden y subclonan, si se desea, y se ensayan los sobrenadantes con respecto a actividad anti-inmunógeno mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo de enzimas o inmunoensayo de fluorescencia).

20 Los hibridomas que pueden usarse como fuentes de anticuerpos abarcan todas las células derivadas descendientes de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales específicos para IL-7R, o una parte de los mismos.

25 Los hibridomas que producen tales anticuerpos pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los medios de cultivo o fluidos corporales, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, puede eliminarse, por ejemplo, mediante la ejecución de la preparación sobre adsorbentes preparados del inmunógeno unido a fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un IL-7R α humano o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada con una proteína que es inmunógena en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja que usa un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R^1 son grupos alquilo diferentes, puede producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

30 Si se desea, puede secuenciarse el anticuerpo antagonista de IL-7R (monoclonal o policlonal) de interés y puede después clonarse la secuencia polinucleotídica en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en vector en una célula huésped y la célula huésped puede después expandirse y congelarse para uso futuro. La producción de anticuerpos monoclonales recombinantes en cultivo celular puede llevarse a cabo a través de clonación de genes de anticuerpos de linfocitos B por medios conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Tiller y col., 2008, J. Immunol. Methods 329, 112; Patente de Estados Unidos N° 7.314.622.

35 En una alternativa la secuencia polinucleotídica puede usarse para manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede modificarse por ingeniería genética para asemejarse de forma más cercana a regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmune si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia del anticuerpo para obtener una mayor afinidad con IL-7R y mayor eficacia en la inhibición de IL-7R. Resultará evidente para un experto en la materia que uno o más cambios de polinucleótidos pueden realizarse al anticuerpo antagonista de IL-7R y mantener aún su capacidad de unión a IL-7R.

40 Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de

nucleótidos y aminoácidos predicha de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región flanqueante del anticuerpo usar durante el proceso de humanización (3) las propias metodologías/técnicas de humanización y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivadas de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificado y sus CDR asociadas fusionadas con regiones constantes humanas. Véase, por ejemplo, Winter y col. Nature 349: 293-299, 1991, Lobuglio y col. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 4220-4224, 1989, Shaw y col. J Immunol. 138: 4534-4538, 1987, y Brown y col. Cancer Res. 47: 3577-3583, 1987. Otras referencias describen CDR de roedor introducidas en una región flanqueante (FR) de soporte humana antes de la fusión con una región constante de anticuerpo humano apropiada. Véase, por ejemplo, Riechmann y col. Nature 332: 323-327, 1988, Verhoeven y col. Science 239: 1534-1536, 1988, y Jones y col. Nature 321: 522-525, 1986. Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por regiones flanqueantes de roedor modificadas por ingeniería genética de forma recombinante. Véase, por ejemplo, Publicación de Patente Europea N° 0519596. Estas moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia las moléculas de anticuerpo antihumano de roedor que limita la duración y eficacia de aplicaciones terapéuticas de estos restos en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante del anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética de modo que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, no desencadena lisis del complemento). Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N° PCT/GB99/01441; Solicitud de Patente de Reino Unido No. 9809951.8. Otros procedimientos para humanizar anticuerpos que también pueden utilizarse se divulgan en Daugherty y col., Nucl. Acids Res. 19: 2471-2476, 1991, y en las Patentes de Estados Unidos N° 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la Publicación de PCT N° WO 01/27160.

Resulta evidente que aunque el análisis anterior se refiere a anticuerpos humanizados, los principios generales analizados son aplicables a la adaptación de anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Resulta evidente adicionalmente que uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descrito en el presente documento pueden combinarse, por ejemplo, inserción de CDR, mutación de región flanqueante y mutación de CDR.

En otra divulgación más, pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos mediante el uso de ratones disponibles en el mercado que se han modificado por ingeniería genética para expresar proteínas inmunoglobulinas humanas específicas. Los animales transgénicos que se diseñan para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o más robusta también pueden usarse para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Son ejemplos de dicha tecnología Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una divulgación alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante y expresarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra divulgación alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante mediante tecnología de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Wintery y col., Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455, 1994. Como alternativa, la tecnología de presentación de fagos (McCafferty y col., Nature 348: 552-553, 1990) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo se clonan en fase en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcional en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. De este modo, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación de fagos puede realizarse en una diversidad de formatos; para revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571, 1993. Varias fuentes de segmentos de gen de V pueden usarse para la presentación de fagos. Clackson y col., Nature 352: 624-628, 1991, aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes de V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Mark y col., J. Mol. Biol. 222: 581-597, 1991, o Griffith y col., EMBO J. 12: 725-734, 1993. En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una alta tasa (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad y los linfocitos B que presentan inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican preferentemente y se diferencian durante la presentación de antígenos posterior. Este proceso natural puede imitarse mediante el empleo de la técnica conocida como "redistribución de cadena" (Marks y col., Bio/Technol. 10: 779-783, 1992). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por presentación de fagos puede mejorarse mediante el reemplazo secuencial de los genes de la región V de cadena pesada y ligera con variantes de origen natural (repertorios) de genes de dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de pM-nM. Una estrategia para preparar repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes (también conocidos como "la madre de todas las bibliotecas") se ha descrito por Waterhouse y col., Nucl. Acids Res. 21:2265-2266, 1993. La redistribución de genes también puede usarse para

5 derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedores, cuando el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se denomina "impronta de epítipo", el gen de dominio V de cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedor obtenido por técnica de presentación de fagos se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando quimeras de roedor-humano. La selección de antígenos da como resultado el aislamiento de regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítipo rige (imprime) la selección de compañero. Cuando el procedimiento se repite para reemplazar el dominio V del roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (Véase Publicación de PCT N° WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedor mediante inserción de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos flanqueantes o de CDR del origen de roedor.

10 Los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante primero aislando los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos de los animales huésped, obteniendo la secuencia génica y usando la secuencia génica para expresar el anticuerpo de forma recombinante en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que puede emplearse es expresar la secuencia del anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han divulgado procedimientos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, y col. Vaccine 19:2756, 2001; Lonberg, N. y D. Huszar. Int. Rev. Immunol 13:65, 1995; y Pollock, y col., J Immunol Methods 231:147, 1999. Los procedimientos para preparar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena sencilla, etc. se conocen en la técnica.

15 También pueden emplearse inmunoensayos y técnicas de clasificación de citometría de flujo tales como separación de células activadas por fluorescencia (FACS) para aislar anticuerpos que son específicos de IL-7R.

20 Los anticuerpos pueden unirse a muchos vehículos diferentes. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la divulgación. Los expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos o serán capaces de determinar tales, usando experimentación rutinaria. En algunas divulgaciones, el vehículo comprende un resto que se dirige al miocardio.

25 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión (tales como vectores de expresión divulgados en la Publicación de PCT N° WO 87/04462), que se transfieren después en células huésped tales como células de *E. coli*, células de COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N° WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984, o mediante la unión covalente con la secuencia codificante de inmunoglobulina a toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal de IL-7R en el presente documento.

30 Los anticuerpos antagonistas de IL-7R pueden identificarse o caracterizarse usando procedimientos conocidos en la técnica, por los que se detecta y/o mide la reducción, mejora o neutralización de la actividad biológica de IL-7R. En algunas divulgaciones, un anticuerpo antagonista de IL-7R se identifica mediante la incubación de un agente candidato con IL-7R y el control de la unión y/o reducción o neutralización acompañante de una actividad biológica de IL-7R. El ensayo de unión puede realizarse con un polipéptido o polipéptidos de IL-7R purificados o con células que expresan de forma natural o transfectadas para expresar polipéptido o polipéptidos de IL-7R. En una divulgación, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitiva, en el que se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un antagonista de IL-7R conocido con respecto a unión de IL-7R. El ensayo puede realizarse en diversos formatos, incluyendo el formato ELISA. En otras divulgaciones, se identifica un anticuerpo antagonista de IL-7R mediante la incubación de un agente candidato con IL-7R y el control de la unión e inhibición acompañante de la fosforilación de STAT5.

35 Tras la identificación inicial, la actividad de un anticuerpo antagonista de IL-7R candidato puede confirmarse y refinarse adicionalmente mediante bioensayos, que se sabe que prueban las actividades biológicas diana. Como alternativa, pueden usarse bioensayos para explorar candidatos directamente. Algunos de los procedimientos para identificar y caracterizar anticuerpos antagonistas de IL-7R se describen en detalle en los ejemplos.

40 Los anticuerpos antagonistas de IL-7R pueden caracterizarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento es identificar el epítipo al que se une o "mapeo de epítipos". Existen muchos procedimientos conocidos en la técnica para mapear y caracterizar la localización de epítipos en proteínas, incluyendo resolver la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmento génico y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el capítulo 11 de

Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo de epítomos puede usarse para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo antagonista de IL-7R. El mapeo de epítomos está disponible en el mercado de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). El epítopo puede ser un epítopo lineal, es decir, contenido en un tramo único de aminoácidos o un epítopo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que pueden no estar necesariamente contenidos en un tramo único. Péptidos de diversas longitudes (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud) pueden aislarse o sintetizarse (por ejemplo, de forma recombinante) y usarse para ensayos de unión con un anticuerpo antagonista de IL-7R. En otro ejemplo, el epítopo al que se une el anticuerpo antagonista de IL-7R puede determinarse en una exploración sistemática mediante el uso de péptidos solapantes derivados de la secuencia de IL-7R y determinando la unión por el anticuerpo antagonista de IL-7R. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos génicos, la fase abierta de lectura que codifica IL-7R se fragmenta aleatoriamente o mediante construcciones genéticas específicas y la reactividad de los fragmentos expresados de IL-7R con el anticuerpo a ensayar se determinan. Los fragmentos génicos pueden, por ejemplo, producirse por PCR y después transcribirse y traducirse a proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos de IL-7R marcados de forma radiactiva se determina después mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítomos también pueden identificarse mediante el uso de grandes bibliotecas de secuencias peptídicas aleatorias presentadas en la superficie de partículas de fago (bibliotecas de fago). Como alternativa, una biblioteca definida de fragmentos peptídicos solapantes puede ensayarse con respecto a unión al anticuerpo de ensayo en ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, puede realizarse mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión de epítopo. Por ejemplo, pueden realizarse experimentos de intercambio de dominio usando un IL-7R mutante en el que diversos fragmentos del polipéptido IL-7R se han reemplazado (intercambiado) con secuencias de IL-7R de otra especie o una proteína cercanamente relacionada pero antigénicamente distinta (tal como otro miembro de la familia de la proproteína convertasa). Mediante la evaluación de la unión del anticuerpo al IL-7R mutante, la importancia de la unión de fragmento de IL-7R particular a anticuerpo puede evaluarse.

Otro procedimiento más que puede usarse para caracterizar un anticuerpo antagonista de IL-7R es usar ensayos de competición con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, diversos fragmentos en IL-7R, para determinar si el anticuerpo antagonista de IL-7R se une al mismo epítopo como otros anticuerpos. Los ensayos de competición se conocen bien por los expertos en la materia.

Un vector de expresión puede usarse para dirigir la expresión de un anticuerpo antagonista de IL-7R. Un experto en la materia está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.436.908, 6.413.942 y 6.376.471. La administración de vectores de expresión incluye administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, pistola de partículas o administración por catéter y administración tópica. En otra divulgación, el vector de expresión se administra directamente al ganglio o tronco simpático o en una arteria coronaria, aurícula, ventrículo o pericardio.

Puede usarse también el suministro dirigido de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de suministro de ADN mediado por receptor se describen en, por ejemplo, Findeis y col., Trends Biotechnol., 1993, 11:202; Chiou y col., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer, J.A. Wolff, ed., 1994; Wu y col., J. Biol. Chem., 1988, 263:621; Wu y col., J. Biol. Chem., 1994, 269:542; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:3655; Wu y col., J. Biol. Chem., 1991, 266:338. Se administran composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. Los intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN también pueden usarse durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden suministrarse usando vehículos de suministro génico. El vehículo de suministro génico puede ser de origen viral o no viral (véase, generalmente, Jolly, Cancer Gene Therapy, 1994, 1:51; Kimura, Human Gene Therapy, 1994, 5:845; Connelly, Human Gene Therapy, 1995, 1:185; y Kaplitt, Nature Genetics, 1994, 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes puede inducirse usando promotores de mamíferos endógenos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o regulada.

Los vectores basados en virus para el suministro de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada se conocen bien en la técnica. Los vehículos basados en virus ejemplares incluyen, sin limitación, los retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, las Publicaciones de PCT N° WO 90/07936, WO 94/03622, WO 93/25698, WO 93/25234, WO 93/11230, WO 93/10218, WO 91/02805, las Patente de Estados Unidos N° 5.219.740 y 4.777.127; Patente de Reino Unido N° 2.200.651 y Patente de EP N° 0 345 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del Rio Ross (ATCC VR-373, ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR 1249, ATCC VR-532)) y vectores de virus adenoasociados (AAV) (véase, por ejemplo, Publicaciones de PCT N° WO 94/12649, WO 93/03769, WO 93/19191, WO 94/28938, WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse administración de ADN unida a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147.

También pueden emplearse vehículos y procedimientos de suministro no virales, incluyendo, pero sin limitación, ADN condensado policatiónico unido o no unido a adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curriel, Hum Gene Ther, 1992, 3:147); ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol Chem, 1989, 264:16985); células vehículos de suministro de células eucariotas (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.814.482; Publicaciones de PCT N° WO 95/07994, WO 96/17072, WO 95/30763 y WO 97/42338) y neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Se describen procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares en la Publicación de PCT N° WO 90/11092 y la Patente de Estados Unidos N° 5.580.859. Se describen liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro génico en la Patente de Estados Unidos N° 5.422.120; las Publicaciones de PCT N° WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445; y el documento EP 0524968. Se describen enfoques adicionales en Philip, Mol. Cell. Biol., 1994, 14:2411, y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91:1581.

En algunas realizaciones, la invención abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden anticuerpos, de acuerdo con la invención, descritos en el presente documento o de acuerdo con la presente invención preparados por los procedimientos y que tiene las características descritas en el presente documento. Como se divulga en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que antagonizan la interacción de IL-7R con IL-7, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más de estos anticuerpos. Estas composiciones pueden comprender adicionalmente excipientes adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que se conocen bien en la técnica.

Los anticuerpos antagonistas de IL-7R de la divulgación se caracterizan por cualquiera (uno o más) de las siguientes características: (a) unión a IL-7R, (b) bloqueo de interacción de IL-7R con IL-7; (c) bloqueo o disminución de la fosforilación de STAT5 mediada por IL-7; (d) disminución de los niveles de glucosa en sangre *in vivo*, (e) mejora de la tolerancia a la glucosa *in vivo*; y (f) reducción de la gravedad de la enfermedad en EAE. Preferentemente, los anticuerpos antagonistas de IL-7R tienen dos o más de estas características. Más preferentemente, los anticuerpos tienen tres o más de las características. Más preferentemente, los anticuerpos tienen cuatro o más de las características. Más preferentemente, los anticuerpos tienen cinco o más de las características. Más preferentemente los anticuerpos tienen las seis características.

En consecuencia, la divulgación proporciona cualquiera de los siguientes, o composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los siguientes: (a) un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena ligera parcial de

30 NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI
SGLVTEDEADYYCQSYDSSHLLVFGGGTKLTVLC (SEC ID N° 1),

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGRIASSYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI
SGLKTEDEADYYCQSYASSLLWVFGGGTQLTVLS (SEC ID N° 3),

35 NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI
SGLVTEDEADYYCMQYDSSHLLVFGGGTKLTVLC (SEC ID N° 5),

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI
SGLVTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVLC (SEC ID N° 7),

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI
SGLVTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVLC (SEC ID N° 9),

40 NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI
SGLVTEDEADYYCMQYDFHHLVFGGGTKLTVLC (SEC ID N° 11),

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI
SGLKTEDEADYYCMQYDFHHLVFGGGTKLTVL (SEC ID N° 44), o

45 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTI
SGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVL (SEC ID N° 41); y (b) un anticuerpo que tiene una secuencia de
cadena pesada parcial de

QVNLRESGGGLVKPGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWLSLVGWDGSATYYADSVKGRFTISRDN
KNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYVFDYWGQGLTVTVSS (SEC ID N° 2),

50 QVTLKESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWRQAPGKGLEWLSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN
KNTVYLQMNSLRDEDTAVYYCARDISGGMDVWGQGTITVTVSS (SEC ID N° 4),

QVNLRESGGGLVKPGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWLSLVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDN
KNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYVFNWVGQGLTVTVSS (SEC ID N° 6),

QVNLRESGGGLVKPGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWLSLVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDN
KNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGDYWGQGLTVTVSS (SEC ID N° 8),

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWLSLVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDN
KNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGLTVTVSS (SEC ID N° 10),

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWLSLVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDN
KNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGLTVTVSS (SEC ID N° 12), o

5 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWVSLVGDGFFTYADSVKGRFTISRDN
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGLTVTVSS (SEC ID N° 40).

Tabla 1

mAb	Cadena Ligera	Cadena Pesada
10 P3A9	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCT TRSSGSID SSYVQ WYQQRPGNSPTTVIY EDDQRPSG VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC QSYDSSHLLV FGGGTKLTVLC (SEC ID N° 1)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFDDSVM HWVRQAPGKGLEWLSLV GWDGSATYYADSVKGR FTISRDNTKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QGDY VFDY WGQGLTVTVSS (SEC ID N° 2)
15 P4B3	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCT GSSSGRIA SSYVQ WYQQRPGNSAPTIVY EDNQRPSG VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEAD YYC QSYASSLLWV FGGGTQLTVLS (SEC ID N° 3)	QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTVYLQMNSLRDEDTAVYYCARD IS GGMDV WGQGTTVTVSS (SEC ID N° 4)
P2D2	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCT TRSSGSID SSYVQ WYQQRPGNSPTTVIY EDDQRPSG VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC MQYDSSHLLV FGGGTKLTVLC (SEC ID N° 5)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFDDSVM HWVRQAPGKGLEWLSLV GWDGFFTYADSVKGRF TISRDNKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QGDYV FNN WGQGLTVTVSS (SEC ID N° 6)
20 P2E11	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCT TRSSGSID SSYVQ WYQQRPGNSPTTVIY EDDQRPSG VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC QSYDFHHLV FGGGTKLTVLC (SEC ID N° 7)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFDDSVM HWVRQAPGKGLEWLSLV GWDGFFTYADSVKGRF TISRDNKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QGDYM GDY WGQGLTVTVSS (SEC ID N° 8)
25 HAL 403a	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCT TRSSGSID SSYVQ WYQQRPGNSPTTVIY EDDQRPSG VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC QSYDFHHLV FGGGTKLTVLC (SEC ID N° 9)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFDDSVM HWVRQAPGKGLEWLSLV GWDGFFTYADSVKGRF TISRDNKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QGDYM GNN WGQGLTVTVSS (SEC ID N° 10)
HAL 403b	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCT TRSSGSID SSYVQ WYQQRPGNSPTTVIY EDDQRPSG VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC MQYDFHHLV FGGGTKLTVLC (SEC ID N° 11)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFDDSVM HWVRQAPGKGLEWLSLV GWDGFFTYADSVKGRF TISRDNKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QGDYM GNN WGQGLTVTVSS (SEC ID N° 12)
30 C1GM	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCT TRSSGSID SSYVQ WYQQRPGSSPTTVIY EDDQRPSG VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEAD YYC QSYDFHHLV FGGGTKLTVL (SEC ID N° 41)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFDDSVMH WVRQAPGKGLEWVSLV GWDGFFTYADSVKGRFT ISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QGDYMG NN WGQGLTVTVSS (SEC ID N° 40)
35 C2M3	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCT TRSSGSID SSYVQ WYQQRPGSSPTTVIY EDDQRPSG VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEAD YYC MQYDFHHLV FGGGTKLTVL (SEC ID N° 44)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFDDSVMH WVRQAPGKGLEWVSLV GWDGFFTYADSVKGRFT ISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR QGDYMG NN WGQGLTVTVSS (SEC ID N° 40)

En la Tabla 1, las secuencias subrayadas son secuencias de CDR de acuerdo con Kabat y en negrita de acuerdo con Chothia.

La divulgación también proporciona partes de CDR de anticuerpos para IL-7R (incluyendo CDR Chothia, Kabat y regiones de contacto de CDR). La determinación de regiones de CDR está dentro de la experiencia de la técnica. Se

entiende que en algunas divulgaciones, las CDR puede ser una combinación de las CDR de Kabat y Chothia (también denominadas “CR combinadas” o “CDR prolongadas”). En algunas divulgaciones, las CDR son las CDR de Kabat. En otras divulgaciones, las CDR son las CDR de Chothia. En otras palabras, en divulgaciones con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de CDR de Kabat, de Chothia, de combinación, o combinaciones de las mismas. La Tabla 2 proporciona ejemplos de secuencias de CDR proporcionadas en el presente documento.

Tabla 2

Cadena Pesada			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
P3A9	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGSATYYADSVKG (SEC ID N° 21)	QGDYVFDY (SEC ID N° 24)
P4B3	NYGMH (SEC ID N° 20)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEC ID N° 22)	DISGGGMDV (SEC ID N° 25)
P2D2	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYVFNN (SEC ID N° 26)
P2E11	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYMGDY (SEC ID N° 27)
HAL 403a	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYMGNN (SEC ID N° 28)
C1GM	DSVMH (SEC ID N° 19) (Kabat); GFTFDDS (SEC ID N° 46) (Chothia); GFTFDDSVMH (SEC ID N° 47) (prolongada)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23) (Kabat); GWDGFF (SEC ID N° 48) (Chothia);	QGDYMGNN (SEC ID N° 49);
C2M3	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYMGNN (SEC ID N° 49)
HAL 403b	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYMGNN (SEC ID N° 28)
Consenso de Cadena Pesada	X ₁ X ₂ VMH, en la que X ₁ es D o N; X ₂ es S o Y (SEC ID N° 50)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GX ₆ X ₇ TYADSV KG, en la que X ₁ es L o A; X ₂ es V o I; X ₃ es G o S; X ₄ es W o G; X ₅ es D o S; X ₆ es F, G o S; X ₇ es F, A o S (SEC ID N° 51)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ , en la que X ₁ es Q o D; X ₂ es G o I; X ₃ es D o S; X ₄ es Y o G; X ₅ es M, V o G; X ₆ es G o F; X ₇ es N, D o M; X ₈ es N, Y o D (SEC ID N° 52)
Cadena Ligera			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
P3A9	TRSSGSIDSSVYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	QSYDSSHLV (SEC ID N° 33)
P4B3	TGSSGRIASSVYVQ (SEC ID N° 30)	EDNQRPS (SEC ID N° 32)	QSYASSLWV (SEC ID N° 34)

Cadena Ligera			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
5 P2D2	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	MQYDSSHLV (SEC ID N° 35)
P2E11	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	QSYDFHHLV (SEC ID N° 36)
10 HAL 403a	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	QSYDFHHLV (SEC ID N° 36)
C1GM	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	QSYDFHHLV (SEC ID N° 36)
C2M3	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	MQYDFHHLV (SEC ID N° 37)
15 HAL 403b	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	MQYDFHHLV (SEC ID N° 37)
20 Consenso de Cadena Ligera	TX ₁ SSGX ₂ IX ₃ SSYVQ en la que X ₁ es R o G; X ₂ es S o R; X ₃ es D o A (SEC ID N° 53)	EDX ₁ QRPS en la que X ₁ es D o N (SEC ID N° 54)	X ₁ X ₂ YX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ LX ₇ En la que X ₁ es Q o M; X ₂ es S o Q; X ₃ es D o A; X ₄ es F o S; X ₅ es H o S; X ₆ es H o S; X ₇ es V o W (SEC ID N° 55)

Las regiones de contacto de CDR son regiones de un anticuerpo que imbuyen especificidad al anticuerpo para un antígeno. En general, las regiones de contacto de CDR incluyen las posiciones de restos en el CDR y zonas de Vernier, que se restringen para mantener una estructura de bucle apropiada para que el anticuerpo se una a un antígeno específico. Véase, por ejemplo, Makabe y col., 2007, "Thermodynamic Consequences of Mutations in Vernier Zone Residues of a Humanized Anti-human Epidermal Growth Factor Receptor Murine Antibody," Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. La determinación de las regiones de contacto de CDR está dentro de la experiencia de la técnica. En algunas divulgaciones, un anticuerpo antagonista de IL-7R comprende una o más regiones de contacto de CDR que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en FTFDDSV (SEC ID N° 56), GWDGFF (SEC ID N° 57), ARX₁X₂X₃X₄ en la que X₁, X₂, X₃ y X₄ pueden ser cualquier aminoácido, (SEC ID N° 58), SGSIDSSY (SEC ID N° 59), EDDQRPSGV (SEC ID N° 60) y FHHL (SEC ID N° 61).

La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo antagonista de IL-7R con IL-7R puede ser de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 200 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 200 nM, 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, de acuerdo con la invención aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM o aproximadamente 2 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menor de cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, de acuerdo con la invención aproximadamente 100 pM o aproximadamente 50 pM.

La invención también proporciona procedimientos para la preparación de cualquiera de estos anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica o de otro tipo de los anticuerpos, mediante procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos sencillos o de fusión) como se ha descrito anteriormente o mediante síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se preparan convenientemente por síntesis química. Los procedimientos de síntesis química se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, un anticuerpo podría producirse por un sintetizador de

polipéptidos automático que emplea el procedimiento de fase sólida. Véase también, las patentes de Estados Unidos N° 5.807.715; 4.816.567 y 6.331.415.

5 En otra alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. En una realización, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica las regiones variables de cadena pesada y/o de cadena ligera del anticuerpo P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a, HAL403b, C1GM o C2M3. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede expandirse después y congelarse para uso futuro. Los vectores (incluyendo vectores de expresión) y células huésped se describen adicionalmente en el presente documento.

10 La divulgación también abarca scFv de anticuerpos de la presente invención. Los fragmentos de región variable de cadena sencilla se preparan mediante la unión de regiones variables de cadena ligera y/o pesada usando un péptido de enlace corto (Bird y col., 1988, Science 242:423-426). Un ejemplo de un péptido de enlace es (GGGGS)₃ (SEC ID N° 13), que une aproximadamente 3,5 nm entre el extremo carboxi terminal de una región variable y el extremo amino terminal de la otra región variable. Se han diseñado y usado engarces de otras secuencias (Bird y col., 1988, mencionado anteriormente). Los engarces deberían ser polipéptidos cortos, flexibles y preferentemente comprender menos de 20 restos aminoacídicos. Los engarces pueden a su vez modificarse para funciones adicionales, tales como unión de fármacos o unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena sencilla pueden producirse de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automático. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contiene polinucleótido que codifica el scFv en una célula huésped adecuada, eucariota, tal como células de levadura, de planta, de insecto o de mamífero o procariota, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden prepararse por manipulaciones rutinarias tales como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en la materia.

25 También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos divulgados. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios variables de cadena pesada (VH) y variables de cadena ligera (VL) se expresan en una cadena polipeptídica sencilla, pero usando un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., y col, 1993, Proc Natl Acad Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., y col, 1994, Structure 2:1121-1123).

30 Por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes, pueden prepararse usando los anticuerpos divulgados en el presente documento. Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Suresh y col., 1986, Methods in Enzymology 121: 210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basó en la coexpresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas diferentes especificidades (Millstein y Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

40 De acuerdo con un enfoque para preparar anticuerpos biespecíficos, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de región constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las relaciones no tienen particular relevancia.

50 En un enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en una rama y un par de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en la otra rama. Esta estructura asimétrica, con una cadena ligera de inmunoglobulina solamente en una mitad de la molécula biespecífica, facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas. Este enfoque se describe en la Publicación de PCT WO 94/04690.

55 Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos unidos covalentemente, también están dentro del ámbito de la divulgación. Dichos anticuerpos se han usado para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para tratamiento de infección por VIH (Publicaciones de PCT N° WO 91/00360 y WO 92/200373; documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de entrecruzamiento conveniente. Los agentes y técnicas de entrecruzamiento adecuados se conocen bien en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

60

También pueden prepararse anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* usando procedimientos conocidos de química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

5 Pueden prepararse anticuerpos humanizados usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de aminoácidos predicha y de nucleótidos de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida, (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región flanqueante de anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización, (3) las propias metodologías/técnicas de humanización y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.567; 5.807.715; 10 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

En los anticuerpos humanizados recombinantes, la parte Fc γ puede modificarse para evitar la interacción con el receptor de Fc γ y los sistemas de complemento e inmune. Las técnicas para preparación de tales anticuerpos se describen en el documento WO 99/58572. Por ejemplo, la región constante puede modificarse por ingeniería genética para asemejarse más a regiones constantes humanas para evitar respuesta inmune si el anticuerpo se usa en ensayos 15 clínicos y tratamientos en seres humanos. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.997.867 and 5.866.692.

La divulgación abarca modificaciones de los anticuerpos y polipéptidos de la invención variantes mostrados en la Tabla 1, incluyendo anticuerpos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente a sus propiedades y 20 variantes que tiene actividad y/o afinidad potenciada o reducida. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede mutarse para obtener un anticuerpo con la afinidad de unión deseada para IL-7R. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no necesita describirse en detalle en el presente documento. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservativas de restos aminoacídicos, una o más 25 deleciones o adiciones de aminoácidos que no cambian de forma significativamente deletérea la actividad funcional o que maduran (potencian) la afinidad del polipéptido por su ligando o uso de análogos químicos.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxi terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contiene cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos aminoacídicos sencillos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un marcador de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula 30 anticuerpo incluyen la fusión con el extremo C-terminal o N-terminal del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en la circulación sanguínea.

Las variantes de sustitución tienen al menos un resto aminoacídico en la molécula de anticuerpo retirada y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la 35 Tabla 3 bajo el encabezamiento de "sustituciones conservativas". Si tales sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 3, o como se describe adicionalmente posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, pueden introducirse y explorarse los productos.

Tabla 3: Sustituciones de Aminoácidos

Resto Original	Sustituciones Conservativas	Sustituciones Ejemplares
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
45 Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
50 His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg

	Resto Original	Sustituciones Conservativas	Sustituciones Ejemplares
	Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
5	Leu (L)	Ile	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
	Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
	Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
	Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
	Pro (P)	Ala	Ala
10	Ser (S)	Thr	Thr
	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
	Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
15	Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

Se consiguen modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) No-polares: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polares sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Ácidos (cargados negativamente): Asp, Glu;
- (4) Básicos (cargados positivamente): Lys, Arg;
- 25 (5) Restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro; y
- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

Se realizan sustituciones no conservativas mediante intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, puede añadirse un enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad, particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv.

Las modificaciones de aminoácidos pueden variar de cambiar o modificar uno o más aminoácidos a un rediseño completo de una región, tal como la región variable. Los cambios en la región variable pueden alterar la afinidad y/o especificidad de unión. En algunas divulgaciones, no se realizan más de una a cinco sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de un dominio CDR. En otras divulgaciones, no se realizan más de una a tres sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de un dominio CDR. En otras divulgaciones más, el dominio CDR es CDR H3 y/o CDR L3.

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glucosilados y no glucosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales, tales como, por ejemplo, glucosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos se glucosilan en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, Chem. Immunol. 65: 111-128; Wright y Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd y col., 1996, Mol. Immunol. 32: 1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, Biochem. 29: 4175-4180) y la interacción intramolecular entre partes de la glucoproteína, que pueden afectar a la conformación y superficie tridimensional presentada de la glucoproteína (Jefferis y Lund, mencionado anteriormente; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7: 409-416). Los oligosacáridos también

pueden servir para dirigir una glucoproteína dada a ciertas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. También se ha indicado que la glucosilación de anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En particular, las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc de bisección, se ha indicado que han mejorado la actividad de ADCC (Umana y col., 1999, *Mature Biotech.* 17:176-180).

La glucosilación de anticuerpos típicamente está enlazada en N o enlazada en O. Enlazada en N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, siendo X cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación enlazada en O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un ácido hidroxiamínico, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de modo que contiene una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios y glucosilación enlazados en N). La alteración puede también realizarse mediante la adición de, o sustitución con, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación enlazada en O).

El patrón de glucosilación del anticuerpo también puede alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glucosilación depende ampliamente de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Puesto que el tipo celular usado para la expresión de glucoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como agentes terapéuticos potenciales raramente es la célula nativa, pueden esperarse variaciones en el patrón de glucosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo, Hse y col., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070).

Además de la selección de células huésped, los factores que pueden afectar a la glucosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de los medios, densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos procedimientos para alterar el patrón de glucosilación conseguido en un organismo huésped particular incluyendo la introducción o sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en producción de oligosacáridos (Patentes de Estados Unidos Nº 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glucosilación, o ciertos tipos de glucosilación, puede eliminarse enzimáticamente de la glucoproteína, por ejemplo, usando endoglucosidasa H (Endo H), N-glucosidasa F, endoglucosidasa F1, endoglucosidasa F2, endoglucosidasa F3. Además, la célula huésped recombinante puede modificarse por ingeniería genética para ser deficiente en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Esta y otras técnicas similares se conocen bien en la materia.

Otros procedimientos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la materia, incluyendo, sin limitación, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Pueden usarse modificaciones, por ejemplo, para la unión de marcadores para inmunoensayo. Se preparan polipéptidos modificados usando procedimientos usados en la técnica y pueden explorarse usando ensayos convencionales conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen posteriormente y en los ejemplos.

En algunas divulgaciones de la invención, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que tiene afinidad aumentada para un receptor Fc gamma humano, es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo, no desencadena lisis mediada por complemento, no estimula citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o no activa microglía; o tiene actividades reducidas (en comparación con el anticuerpo no modificado) en una cualquiera o más de las siguientes: desencadenar la lisis mediada por complemento, estimular la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o activar microglía. Diferentes modificaciones de la región constante pueden usarse para conseguir un nivel y/o combinación óptimos de las funciones efectoras. Véase, por ejemplo, Morgan y col., *Immunology* 86: 319-324, 1995; Lund y col., *J. Immunology* 157: 4963-9 157:4963-4969, 1996; Idusogie y col., *J. Immunology* 164:4178-4184, 2000; Tao y col., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; y Jefferis y col., *Immunological Reviews* 163: 59-76, 1998. En algunas divulgaciones, la región constante se modifica como se describe en *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29: 2613-2624; Solicitud de PCT Nº PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente de Reino Unido Nº 9809951.8. En otras divulgaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG2 de cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo silvestre). *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29: 2613-2624. En otras divulgaciones más, la región constante está aglucosilada para glucosilación enlazada en N. En algunas divulgaciones, la región constante está aglucosilada para glucosilación enlazada en N mediante la mutación del resto aminoacídico glucosilado o restos flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de N-glucosilación en la región constante. Por ejemplo, el sitio de N-glucosilación N297 puede mutarse a A, Q, K o H. Véase, Tao y col., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; y Jefferis y col., *Immunological Reviews* 163: 59-76, 1998. En algunas divulgaciones, la región constante se aglucosila para glucosilación enlazada en N. La región constante puede estar glucosilada para glucosilación enlazada en N enzimáticamente (tal como retirando carbohidratos por la enzima PNGasa) o mediante expresión en una célula huésped deficiente en glucosilación.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado como se describe en la Publicación de PCT N° WO 99/58572. Estos anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a toda o parte de una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces de unirse a la molécula diana sin desencadenar una lisis dependiente de complemento significativa o destrucción mediada por células de la diana. En algunas divulgaciones, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o Fc γ R1Ib. Esto se basa típicamente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios C_H2 de cadena pesada de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para su uso en terapia de anticuerpos crónica, para evitar reacciones inflamatorias o adversas de otro tipo ante terapia de anticuerpos convencional.

La divulgación incluye realizaciones de maduración de afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos con afinidad madurada pueden producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica (Marks y col., 1992, Bio/Technology, 10: 779-783; Barbas y col., 1994, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813; Schier y col., 1995, Gene, 169: 147-155; Yelton y col., 1995, J. Immunol., 155: 1994-2004; Jackson y col., 1995, J. Immunol., 154(7): 3310-9; Hawkins y col., 1992, J. Mol. Biol., 226: 889-896; y Publicación de PCT N° WO2004/058184).

Los siguientes procedimientos pueden usarse para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una forma de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (tal como mejorar) la afinidad de un polipéptido, tal como un anticuerpo, se denomina "mutagénesis de exploración de biblioteca". Generalmente, la mutagénesis de exploración de biblioteca funciona como sigue. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se reemplazan con dos o más (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20) aminoácidos usando procedimientos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas divulgaciones, una por cada posición de aminoácidos que se analiza), cada una con una complejidad de dos o más miembros (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada posición). Generalmente, la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca), de cada biblioteca se exploran con respecto a afinidad de unión con el polipéptido diana (u otra diana de unión) y se identifican candidatas con unión mejorada, la misma, disminuida o ninguna. Los procedimientos para determinar afinidad de unión se conocen bien en la técnica. La afinidad de unión puede determinarse usando análisis de resonancia de plasmón superficial Biacore™, que detecta diferencias en la afinidad de unión de aproximadamente dos veces o más. Biacore™ es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con una afinidad relativamente alta, por ejemplo, una K_D de aproximadamente 10 nM o menos. La exploración usando resonancia de plasmón superficial de Biacore™ se describe en los Ejemplos, en el presente documento.

La afinidad de unión puede determinarse usando biosensor Kinexa, ensayos de proximidad de centelleo, ELISA, inmunoensayo ORIGEN (IGEN), interrupción de fluorescencia, transferencia de fluorescencia y/o presentación de levadura. La afinidad de unión también puede explorarse usando un bioensayo adecuado.

En algunas divulgaciones, cada posición de aminoácidos en una CDR se reemplaza (en algunas divulgaciones, una cada vez) con los 20 aminoácidos naturales usando procedimientos de mutagénesis reconocidos en la técnica (algunos de los cuales se describen en el presente documento). Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas divulgaciones, una por cada posición de aminoácido que se analiza), cada una con una complejidad de 20 miembros (si se sustituyen los 20 aminoácidos en cada posición).

En algunas realizaciones, la biblioteca a explorar comprende sustituciones en dos o más posiciones, que pueden estar en la misma CDR o en dos o más CDR. De este modo, la biblioteca puede comprender sustituciones en dos o más posiciones en una CDR. La biblioteca puede comprender sustitución en dos o más posiciones en dos o más CDR. La biblioteca puede comprender sustitución en 3, 4, 5 o más posiciones, dichas posiciones halladas en dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR. La sustitución puede prepararse usando codones de baja redundancia. Véase, por ejemplo, Tabla 2 de Balint y col., 1993, Gene 137(1): 109-18.

La CDR puede ser CDR H3 y/o CDR L3. La CDR puede ser una o más de CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, y/o CDRH3. La CDR puede ser una CDR de Kabat, una CDR de Chothia, o una CDR prolongada.

Pueden secuenciarse candidatas con unión mejorada, identificando de este modo un mutante de sustitución de CDR que da como resultado una afinidad mejorada (también denominada una sustitución "mejorada"). Los candidatas que se unen también pueden secuenciarse, identificando de este modo una sustitución de CDR que conserva unión.

Pueden realizarse múltiples rondas de exploración. Por ejemplo, los candidatas (comprendiendo cada uno una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de una o más CDR) con unión mejorada también son útiles para el diseño de una segunda biblioteca que contiene al menos el aminoácido original y sustituido en cada posición de CDR mejorada (es decir, posición de aminoácidos en la CDR en la que un mutante de sustitución mostró unión mejorada). La preparación y exploración o selección de esta biblioteca se analizan adicionalmente posteriormente.

La mutagénesis de exploración de biblioteca también proporciona un medio para caracterizar una CDR, en tanto que la frecuencia de clones con unión mejorada, la misma unión, unión disminuida o sin unión también proporciona

información relacionada con la importancia de cada posición de aminoácidos para la estabilidad del complejo anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, si una posición de la CDR conserva unión cuando se cambia a los 20 aminoácidos, esa posición se identifica como una posición que es improbable que se requiera para unión a antígeno. Por el contrario, si una posición de CDR conserva unión sólo en un pequeño porcentaje de sustituciones, esa posición se identifica como una posición que es importante para la función de CDR. De este modo, los procedimientos de mutagénesis de exploración de biblioteca generan información con respecto a las posiciones en las CDR que pueden cambiarse a muchos aminoácidos diferentes (incluyendo los 20 aminoácidos) y posiciones en las CDR que no pueden cambiarse o que pueden cambiarse solamente a unos pocos aminoácidos.

Los candidatos con afinidad mejorada pueden combinarse en una segunda biblioteca que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición y pueden incluir adicionalmente sustituciones adicionales en esa posición, dependiendo de la complejidad de la biblioteca que se desee o se permite usando el procedimiento de exploración o selección deseado. Además, si se desea, puede seleccionarse aleatoriamente posiciones de aminoácidos adyacentes hasta al menos 2 o más aminoácidos. La selección aleatoria de aminoácidos adyacentes puede permitir flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, que puede a su vez permitir o facilitar la introducción de un mayor número de mutaciones de mejora. La biblioteca puede comprender también sustituciones en posiciones que no mostraron afinidad mejorada en la primera ronda de exploración.

La segunda biblioteca se explora o se selecciona con respecto a miembros de la biblioteca con afinidad de unión mejorada y/o alterada usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, incluyendo exploración usando análisis de resonancia de plasmón superficial de Biacore™ y selección usando cualquier procedimiento conocido de la técnica para selección, incluyendo presentación de fagos, presentación de levaduras y presentación de ribosomas.

La divulgación también abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos de la presente invención. En una divulgación, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región de cadena ligera variable mostrada en las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 41 ó 44 y/o al menos 10 aminoácidos de la región de cadena pesada variable mostrada en la SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 40. En otras divulgaciones, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región de cadena ligera variable y/o al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos de la región de cadena pesada variable. En otra divulgación, el polipéptido de fusión comprende una región variable de cadena ligera y/o una región variable de cadena pesada, como se muestra en cualquiera de los pares de secuencias seleccionados de entre SEC ID N°: 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6, 7 y 8, 9 y 10, 11 y 12, 41 y 40, y 44 y 40. En otra divulgación, el polipéptido de fusión comprende una o más CDR. En otras divulgaciones más, el polipéptido de fusión comprende CDR H3 (VH CDR3) y/o CDR L3 (VL CDR3). Para los fines de la presente invención, una proteína de fusión contiene uno más anticuerpos y otra secuencia de aminoácidos a la que no se une en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región. Las secuencias heterólogas ejemplares incluyen, pero sin limitación, un "marcador" tal como un marcador FLAG o un marcador de 6His. Los marcadores se conocen bien en la técnica.

Un polipéptido de fusión puede crearse por procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, de forma sintética o recombinante. Típicamente, las proteínas de fusión de la presente invención se realizan mediante la separación y expresión de un polinucleótido que las codifica usando procedimientos recombinantes descritos en el presente documento, aunque también pueden prepararse por otros medios conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, síntesis química.

La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos conjugados (por ejemplo, unidos) con un agente que facilitan el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Para simplificar, se hará referencia generalmente a anticuerpos entendiéndose que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión a IL-7R y/o de antagonista descritas en el presente documento. La conjugación generalmente se refiere a la unión de estos componentes como se describe en el presente documento. La unión (que es generalmente disponer estos componentes en asociación cercana al menos para administración) puede conseguirse de cualquier variedad de maneras. Por ejemplo, una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como anhídrido o un haluro ácido o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo un haluro) en el otro.

Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención puede unirse a un agente marcador tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Se conocen en la técnica marcadores que generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal.

La invención también proporciona composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) y, de acuerdo con la divulgación kits que comprenden, como deja claro la presente divulgación, cualquiera o todos los anticuerpos y/o polipéptidos descritos en el presente documento.

La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos de la invención y vectores y células huésped que comprenden el polinucleótido.

5 En consecuencia, la invención proporciona polinucleótidos (o composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los siguientes: los anticuerpos C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a y HAL403b o cualquier fragmento o parte de los mismos que tiene la capacidad de antagonizar IL-7R.

10 Otra divulgación proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) y polipéptidos descritos en el presente documento, tales como anticuerpos y polipéptidos que tienen función efectora alterada. Los polinucleótidos pueden prepararse y expresarse por procedimientos conocidos en la técnica.

15 Otra divulgación proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas divulgaciones, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo como se describe en el presente documento. En otra divulgación, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En otras realizaciones más, la composición comprende ambos o uno de los polinucleótidos mostrados en SEC ID N°: 38 y SEC ID N°: 39 a continuación:

Región variable de cadena pesada C1GM

20 GAGGTCCAGTTAGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGATGATTCTGTGCATGCACTGGGTCCGTCAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTTTC
TCTTGTTGGTTGGGATGGTTTTTTTACATACTATGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAA
CGCGAAGAACTCTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAC
AAGGGGATTACATGGGGAACAACCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC ID N°: 38)

Región variable de cadena ligera C2GM

25 AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGGAATCTCCGGGAAAGACGGTGACCATCTCCTGCACCCGCAG
CAGTGGCAGCATTGACAGTTCTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGCTCCCCACCACTGTGATC
TATGAGGATGACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGC
CTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAAAGTGAAGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATTTTCATCATCT
GGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEC ID N°: 39).

30 En otras divulgaciones más, la composición comprende ambos o uno de los polinucleótidos mostrados en SEC ID N°: 14 y SEC ID N°: 15 a continuación:

Región variable de cadena pesada HAL403a

35 CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTCACCTTTGATGATTCTGTGCATGCACTGGGTCCGTCAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTCTC
TCTTGTTGGTTGGGATGGTTTTTTTACATACTATGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACAA
CACCAAGAACTTACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAC
AAGGGGATTACATGGGGAACAACCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEC ID N°: 14)

Región variable de cadena ligera HAL403a

40 AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGGGTCTCCGGGAAAGACGGTGACCATCTCCTGCACCCGCAG
CAGTGGCAGCATTGACAGTTCTATGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAATTCACCCACCACTGTGATCT
ATGAGGATGACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCC
TCCCTCACCATCTCTGGACTGGTACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATTTTCATCATCTG
GTGTTCCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTATGT (SEC ID N°: 15).

Los vectores de expresión y la administración de composiciones de polinucleótidos se describen adicionalmente en el presente documento.

45 Otra divulgación proporciona un procedimiento para preparar cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento.

50 Polinucleótidos complementarios a cualquiera de tales secuencias también están abarcados por la presente divulgación. Los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNnH, que contienen intrones y corresponden a una molécula de ADN de un modo uno-a-uno y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificantes y no codificantes adicionales pueden, pero no necesitan, estar presentes dentro de un polinucleótido de la presente invención y un polinucleótido puede, pero no necesita, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una parte del mismo) o pueden comprender una variante de una secuencia tal. Las variantes de polinucleótidos contienen una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones de modo que la inmunorreactividad del polipéptido codificado no disminuye, en relación con una molécula inmunorreactiva nativa. El efecto sobre la inmunorreactividad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en el presente documento. Las variantes muestran preferentemente al menos aproximadamente el 70 % de identidad, más preferentemente, al menos aproximadamente el 80 % de identidad, aún más preferentemente, al menos aproximadamente el 90 % de identidad, y más preferentemente, al menos aproximadamente el 95 % de identidad con una secuencia polinucleotídica que codifica un anticuerpo nativo o una parte del mismo.

Dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas se dice que son "idénticas" si la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en las dos secuencias es la misma cuando se alinean para una correspondencia máxima como se describe posteriormente. Las comparaciones entre las dos secuencias se realizan típicamente mediante la comparación de las secuencias sobre una ventana de comparación para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" como se usa en el presente documento se refiere a un segmento de al menos aproximadamente 20 posiciones contiguas, habitualmente de 30 a aproximadamente 75 o de 40 a aproximadamente 50, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que se hayan alineado óptimamente las dos secuencias.

Un alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación puede realizarse usando el programa Megalign en la recopilación de software de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, pág. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenies pág. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferentemente, el "porcentaje de identidad de secuencia" se determina por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la parte de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 % o menos, habitualmente del 5 al 15 por ciento o del 10 al 12 por ciento en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que las bases de ácido nucleico o restos aminoácidos idénticos aparecen en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir el tamaño de ventana) y multiplicando los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Las variantes pueden también, o como alternativa, ser sustancialmente homólogas para un gen nativo o una parte o complemento del mismo. Tales variantes polinucleotídicas son capaces de hibridar en condiciones moderadamente rigurosas con una secuencia de ADN de origen natural que codifica un anticuerpo nativo (o una secuencia complementaria).

"Condiciones moderadamente rigurosas" adecuadas incluyen prelavado en una solución de SSC 5X, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50 °C-65 °C, SSC 5X, durante una noche; seguido de lavado dos veces a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2X, 0,5X y 0,2X que contiene SDS al 0,1 %.

Como se usa en el presente documento, "condiciones altamente rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad" son las que: (1) emplean fuerza iónica baja y temperatura alta para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1 %/Ficoll al 0,1 %/polivinilpirrolidona al 0,1 %/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0.075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1 %, y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55 °C. El experto en la materia reconocerá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de sonda y similares.

Se apreciará por los expertos en la materia que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos portan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente

por la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento son divulgadas. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. Los ARNm y proteínas resultantes pueden, pero no necesitan, tener una estructura o función alteradas. Los alelos pueden identificarse usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias en bases de datos).

Los polinucleótidos de la presente invención pueden obtenerse usando síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Los procedimientos de síntesis de polinucleótidos química se conocen bien en la técnica y no necesitan describirse en detalle en el presente documento. Un experto en la materia puede usar las secuencias proporcionadas en el presente documento y un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN deseada.

Para preparar polinucleótidos usando procedimientos recombinantes, puede insertarse un polinucleótido que comprende una secuencia deseada en un vector adecuado y el vector a su vez puede introducirse en una célula huésped adecuada para replicación y amplificación, como se analiza adicionalmente en el presente documento. Los polinucleótidos pueden insertarse en células huésped por cualquier medio conocido en la técnica. Las células se transforman mediante la introducción de un polinucleótido exógeno por captación directa, endocitosis, transfección, acoplamiento de F o electroporación. Una vez introducido, el polinucleótido exógeno puede mantenerse dentro de la célula como un vector no integrado (tal como un plásmido) o integrarse en el genoma de la célula huésped. El polinucleótido amplificado de este modo puede aislarse de la célula huésped por procedimientos bien conocidos dentro de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989.

Como alternativa, la PCR permite la reproducción de secuencias de AND. La tecnología de PCR se conoce bien en la técnica y se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195, 4.800.159, 4.754.065 y 4.683.202, así como PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis y col. eds., Birkauswer Press, Boston, 1994.

Puede obtenerse ARN usando el ADN aislado en un vector apropiado e insertándolo en una célula huésped adecuada. Cuando la célula se replica y el ADN se transcribe a ARN, el ARN puede aislarse después usando procedimientos bien conocidos para los expertos en la materia, como se expone en Sambrook y col., 1989, mencionado anteriormente, por ejemplo.

Pueden construirse vectores de clonación adecuados de acuerdo con técnicas convencionales o pueden seleccionarse a partir de un gran número de vectores de clonación disponibles en la técnica. Aunque el vector de clonación seleccionado puede variar de acuerdo con la célula huésped que se pretende usar, los vectores de clonación útiles generalmente tendrán la capacidad de auto-replicar, pueden poseer una diana única para una endonucleasa de restricción particular y/o pueden portar genes para un marcador que puede usarse en la selección de clones que contienen el vector. Los ejemplos adecuados incluyen plásmidos y virus bacterianos, por ejemplo, pUC18, pUC19, Bluescript (por ejemplo, pBS SK+) y sus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, ADN de fagos y vectores lanzadera tales como pSA3 y pAT28. Estos y otros muchos vectores de clonación están disponibles de proveedores comerciales tales como BioRad, Strategene e Invitrogen.

Los vectores de expresión generalmente son construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Se implica que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen sin limitación plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, cósmidos y un vector o vectores de expresión divulgados en la Publicación de PCT N° WO 87/04462. Los componentes de vector pueden incluir generalmente, sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de control transcripcional adecuados (tales como promotores, potenciadores y terminador). Para la expresión (es decir, traducción), uno o más elementos de control traduccional también se requieren habitualmente, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de iniciación de la traducción y codones de terminación.

Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de una variedad de medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección que emplea cloruro cálcico, cloruro de rubidio, fosfato cálcico, DEAE-dextrano u otras sustancias, bombardeo de microproyectiles, lipofección e infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso tal como un virus vaccinia). La selección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá con frecuencia de características de la célula huésped.

La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos codificando los anticuerpos de la invención. Cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos puede usarse con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen sin limitación células COS, HeLa y CHO. Véase también la Publicación de PCT N° WO 87/04462. Las células huésped no de mamífero adecuadas incluyen procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levadura (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel aproximadamente 5 veces mayor, más preferentemente, 10 veces mayor, incluso más preferentemente, 20 veces mayor que el del anticuerpo o proteína endógena correspondiente de interés, si está

presente, en las células huésped. La exploración de las células huésped con respecto a una unión específica a IL-7R o un dominio de IL-7R se efectúa por un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobreexpresa el anticuerpo o proteína de interés.

Composiciones

5 Las composiciones usadas en los procedimientos de la invención comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R, o como se divulgó un polipéptido derivado de anticuerpo antagonista de IL-7R u otros antagonistas de IL-7R descritos en el presente documento. También se describen ejemplos de tales composiciones, además de cómo formularlas, en una sección anterior y posteriormente. En algunas realizaciones, la composición comprende uno o más anticuerpos antagonistas de IL-7R divulgados. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R reconoce IL-7R α humano. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R es un anticuerpo humano. En otras realizaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R comprende una región constante que es capaz de desencadenar una respuesta inmune deseada, tal como lisis mediada por anticuerpo o ADCC. En otras divulgaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R comprende una región constante que no desencadena una respuesta inmune no deseada o no deseable, tal como lisis mediada por anticuerpo o ADCC. En otras divulgaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R comprende una o más CDR del anticuerpo (tal como, una, dos, tres, cuatro, cinco o en algunas realizaciones las seis CDR).

Se entiende que las composiciones divulgadas pueden comprender más de un anticuerpo antagonista de IL-7R (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos antagonistas de IL-7R que reconocen diferentes epítomos de IL-7R). Otras composiciones ejemplares comprenden más de un anticuerpo antagonista de IL-7R que reconocen el mismo epítomo o los mismos epítomos o diferentes especies de anticuerpos antagonistas de IL-7R que se unen a diferentes epítomos de IL-7R.

La composición usada en la presente invención puede comprender adicionalmente vehículos excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and practice of Pharmacy 20^a Edición, 2000, Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para receptores a las dosificaciones y concentraciones, y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol fenol, butilo o bencilo; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA, azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contrainformadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilen glicol (PEG). Se describen adicionalmente en el presente documento excipientes farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con la divulgación el anticuerpo antagonista de IL-7R y composiciones del mismo también pueden usarse junto con otros agentes que sirven para mejorar y/o complementar la eficacia de los agentes.

40 D. Kits

La divulgación también proporciona kits para su uso en los presentes procedimientos. Los kits de la divulgación incluyen uno o más recipientes que comprenden un antagonista de IL-7R (tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano) descrito en el presente documento e instrucciones para su uso de acuerdo con cualquiera de los procedimientos de la divulgación descrita en el presente documento. Generalmente, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del antagonista de IL-7R para los tratamientos terapéuticos anteriormente descritos.

En algunas divulgaciones, el antagonista de IL-7R es un anticuerpo antagonista de IL-7R. En algunas divulgaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas divulgaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas divulgaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Las instrucciones relacionadas con el uso de un anticuerpo antagonista de IL-7R generalmente incluyen información con respecto a dosificación, programa de dosificación y vía de administración para el tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, envases a granel (por ejemplo, envases multi dosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones proporcionadas en los kits de la divulgación son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones leíbles por máquina (por ejemplo, instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

Los kits de la presente divulgación están en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, sin limitación, viales, botellas, tarros, envasados flexibles (por ejemplo, bolsas de Mylar o plástico selladas) y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de

administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón atravesable por una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón atravesable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo antagonista de IL-7R. El recipiente puede comprender adicionalmente un segundo agente farmacéuticamente activo.

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales, tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o un prospecto o prospectos en o asociados con el recipiente.

10 Mutaciones y Modificaciones

Para expresar los anticuerpos de IL-7R de la presente invención, pueden obtenerse primero fragmentos de ADN que codifican las regiones VH y VL usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. De acuerdo con la divulgación pueden introducirse diversas modificaciones, por ejemplo, mutaciones, deleciones y/o adiciones a las secuencias de ADN usando procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, puede llevarse a cabo mutagénesis usando procedimientos convencionales, tales como mutagénesis mediada por PCR, en la que los nucleótidos mutados se incorporan a los cebadores de PCR de modo que el producto de PCR contiene las mutaciones deseadas o mutagénesis dirigida.

Un tipo de sustitución, por ejemplo, que puede realizarse es cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, que puede ser químicamente reactivo a otro resto, tal como, sin limitación, alanina o serina. Por ejemplo, puede existir una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución puede realizarse en una CDR o región flanqueante de un dominio variable o en la región constante de un anticuerpo. En algunas realizaciones, la cisteína es canónica.

Los anticuerpos divulgados también pueden modificarse, por ejemplo, en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, una mutación puede realizarse en una o más de las regiones CDR para aumentar o disminuir la K_D del anticuerpo con respecto a IL-7R, para aumentar o disminuir K_{off} o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. Las técnicas en mutagénesis dirigida se conocen bien en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. y Ausubel y col., mencionados anteriormente.

También puede realizarse una modificación o mutación en una región flanqueante o región constante para aumentar la semivida de un anticuerpo de IL-7R. Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N° WO 00/09560. También puede realizarse una mutación en una región flanqueante o región constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para unión covalente o no covalente con otra molécula o para alterar tales propiedades como fijación de complemento, unión de FCR y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo. De acuerdo con la divulgación, un anticuerpo único puede tener mutaciones en una o más de las CDR o regiones flanqueantes del dominio variable o en la región constante.

En un procedimiento conocido como "adaptación a línea germinal", ciertos aminoácidos en las secuencias VH y VL pueden mutarse para coincidir con los hallados de forma natural en las secuencias VH y VL de línea germinal. En particular, las secuencias de aminoácidos de las regiones flanqueantes en las secuencias VH y VL pueden mutarse para coincidir con las secuencias de línea germinal para reducir el riesgo de inmunogenicidad cuando el anticuerpo se administra. Las secuencias de ADN de línea germinal para genes VH y VL humanos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la base de datos de secuencias de línea germinal humana "Vbase"; Véase también Kabat, EA, y col, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N°. 91-3242; Tomlinson y col, 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox y col, 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836.

Otro tipo de sustitución de aminoácidos que puede realizarse es retirar sitios proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Tales sitios pueden aparecer en una región CDR o flanqueante de un dominio variable o en la región constante de un anticuerpo. La sustitución de restos de cisteína y retirada de sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de heterogeneidad en el producto de anticuerpo y aumentar de este modo su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácido es eliminar los pares asparagina-glicina, que forman sitios de desamidación potencial, alterando uno o ambos restos. En otro ejemplo, la lisina C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo de IL-7R de la invención puede escindirse. En diversas divulgaciones de la invención, las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de IL-7R pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

Una vez que los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL de la presente divulgación se obtienen, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpos de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH está unido operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante del anticuerpo o un engarce flexible. La expresión "unido operativamente", como se usa en el presente contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de modo que las secuencias de aminoácidos

codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en fase.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa mediante la unión operativa del ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y col, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N° 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferentemente es una región constante IgG1 o IgG2. La secuencia de región constante de IgG puede ser cualquiera de los diversos alelos o alotipos que se sabe que aparecen entre diferentes individuos, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3) y Gm(17). Estos alotipos representan sustituciones de aminoácidos de origen natural en las regiones constantes de IgG1. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede estar unido operativamente con otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada. La región constante de cadena pesada CH1 puede derivarse de cualquiera de los genes 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 de Fab) mediante la unión operativa de ADN que codifica VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, EA, y col, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242) y se pueden obtener fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. La región constante kappa puede ser cualquiera de los diversos alelos que se sabe que aparecen entre diferentes individuos, tales como Inv(1), Inv(2) e Inv(3). La región constante lambda puede derivar de cualquiera de los tres genes lambda.

Para crear un gen de scFv, se unen operativamente los fragmentos de ADN que codifican VH y VL con otro fragmento que codifica un engarce flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, (SEC ID N° 16) de modo que las secuencias VH y VL se pueden expresar como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones VL y VH unidas por el engarce flexible (véase, por ejemplo, Bird y col, 1988, *Science* 242:423-426; Huston y col, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty y col, 1990, *Nature* 348:552-554). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si sólo se usa una VH y VL sencilla, bivalente, si se usan dos VH y VL o polivalente, si se usan más de dos VH y VL. Pueden generarse anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen específicamente a IL-7R y a otra molécula.

En otra divulgación, puede prepararse un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que comprende todo o una parte de un anticuerpo de IL-7R de la divulgación unido a otro polipéptido. En otra divulgación, solamente los dominios variables del anticuerpo de IL-7R se unen al polipéptido. En otra divulgación, el dominio VH de un anticuerpo de IL-7R se une a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL de un anticuerpo de IL-7R se une a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de modo que los dominios de VH y VL pueden interactuar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno. En otra divulgación preferida, el dominio VH se separa del dominio VL por un engarce de modo que los dominios VH y VL pueden interactuar entre sí. El anticuerpo de VH-engarce-VL se une después al polipéptido de interés. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos de cadena sencilla se unen entre sí. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una cadena polipeptídica sencilla o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

En otras divulgaciones, pueden prepararse otros anticuerpos modificados usando anticuerpo de IL-7R que codifica moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, pueden prepararse "cuerpos Kappa" (Ill y col, 1997, *Protein Eng.* 10:949-57), "Minicuerpos" (Martin y col, 1994, *EMBO J.* 13:5303-9), "Diacuerpos" (Holliger y col, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448), o "Janusin" (Traunecker y col, 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659 y Traunecker y col, 1992, *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52) usando técnicas de biología molecular convencionales siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

Pueden producirse anticuerpos biespecíficos o fragmentos de unión a antígeno por una diversidad de procedimientos incluyendo fusión de hibridomas o unión de fragmentos de Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321, Kostelny y col, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553. Además, pueden formarse anticuerpos biespecíficos como "diacuerpos" o "Janusin". En algunas divulgaciones, el anticuerpo biespecífico se une a dos epitopos diferentes de IL-7R. En algunas divulgaciones, los anticuerpos modificados descritos anteriormente se preparan usando uno o más de los dominios variables o regiones CDR de un anticuerpo humano de IL-7R proporcionado en el presente documento.

55 Generación de anticuerpos específicos de antígeno

Se evaluaron anticuerpos monoclonales inducidos contra quimera IL-7R α /CD127/Fc de ratón recombinante (R y D Systems N° de Cat. 747-MR) y anticuerpos humanos obtenidos mediante bioselección de una biblioteca de anticuerpos vírgenes humanos con IL-7R α recombinante con respecto a su capacidad para unirse a IL-7R humano y de ratón. Los anticuerpos se exploraron adicionalmente con respecto a su capacidad para bloquear la fosforilación de STAT5

mediada por IL-7 en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y/o PBMC de mono. Este modo de preparación de anticuerpos produjo anticuerpos antagonistas que muestran bloqueo de fosforilación de STAT5 mediado por IL-7, como se muestra en el Ejemplo 1.

5 Los materiales representativos de la presente divulgación se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) el ___ de enero de 2011. El vector C1GM-VH que tiene N° de acceso de ATCC ___ es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada C1GM y el vector C1GM-VL que tiene el N° de acceso de ATCC ___ es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera C1GM. Los depósitos se realizaron bajo las disposiciones del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del procedimiento en materia de Patentes y las regulaciones según la presente (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha de depósito. El depósito se pondrá a disponibilidad de acuerdo con ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest y sujeto a un acuerdo entre Pfizer, Inc. y ATCC, que asegura una disponibilidad permanente y sin restricciones de la descendencia del cultivo del depósito al público tras emisión de la Patente de Estados Unidos pertinente o tras la apertura al público de cualquier solicitud de Patente de Estados Unidos o extranjera, la que suceda primero, y asegura la disponibilidad de la descendencia a alguien determinado por el Comisario de Patentes y Marcas Comerciales de Estados Unidos que tiene derecho a ello de acuerdo con 35 U.S.C. Sección 122 y las normas del Comisario conforme a ello (incluyendo 37 C.F.R. Sección 1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

20 El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo del material en depósito muriera o se perdiera o destruyera cuando se cultiva en condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán inmediatamente tras notificación con otro igual. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención en infracción de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con propósitos solamente ilustrativos y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención de ningún modo.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Generación y Exploración de Anticuerpos Antagonistas de IL-7R

Este ejemplo ilustra la generación y exploración de anticuerpos antagonistas de IL-7R.

Procedimientos generales para inmunización de animales para generar anticuerpos monoclonales:

30 Se inmunizó una rata hembra Sprague Dawley de 2 meses con 50 ug de quimera IL-7R α /CD127/Fc recombinante de ratón, que incluye IL-7R α de ratón (Glu21-Asp239), péptido señal hCD33 (Met 1-Ala 16), e IgG humana (Pro100-Lys330) (R&D Systems Cat N° 747-MR). El antígeno se preparó para inmunización mediante la mezcla de 50 μ g de antígeno en 100 μ l de PBS con 100 μ l de sistema adyuvante de Sigma (Cat N° S6322). La mezcla de antígeno se agitó mediante vórtex y se inyectó a las almohadillas plantares traseras y el peritoneo en los días 0, 2, 5 y 7. El día 9, se inyectaron 50 μ g de antígeno sin adyuvante por vía intravenosa en un volumen total de 150 μ l de solución salina fisiológica. El día 13, se prepararon las células del bazo como una suspensión celular sencilla y se fusionaron con células de mieloma de ratón P3x63Ag8.653 siguiendo un protocolo de fusión convencional usando PEG 1500 al 40 % (Boeringer Mannheim Biochemicals N° 783641). Las células fusionadas se resuspendieron en medio que contenía FBS al 18 %, L-glutamina 2 mM, pen/strep, hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) (Sigma H0262) y complemento de clonación y fusión de hibridoma (HFCS) al 10 % (Cat N° 11 363 735 001, Sigma), se sembraron en placas después en 54 placas de 96 de pocillos a 200 μ l/pocillo. El día 7 después de la fusión, se aspiraron 150 μ l del medio de cada pocillo y se realimentaron los pocillos 200 μ l de medio fresco. El día 11-13, se ensayó sobrenadante de cada pocillo con respecto a anticuerpo para IL-7R y Fc humano usando ELISA (descrito posteriormente).

Exploración por ELISA de anticuerpos:

45 Se exploraron los medios sobrenadantes de clones de hibridoma crecientes se forma separada con respecto a su capacidad para unirse al IL-7R de ratón recombinante (rr). Los ensayos se realizaron con placas de 96 pocillos revestidas durante una noche con 50 μ l de una solución 1 μ g/ml del antígeno. Se lavaron cincuenta y cinco placas revestidas 4 veces con PBS con Tween al 0,05 % y después se añadieron 50 μ l de PBS con BSA al 0,5 % a cada pocillo. Se añadieron 5 μ l de cada pocillo de las placas de hibridoma a las placas de ensayo y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir la unión. Los reactivos en exceso se lavaron de los pocillos entre cada etapa con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Se añadieron 50 μ l de F(ab')₂ de cabra anti ratón conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP), específico de Fc (Jackson N° 115-036-008) para unir los anticuerpos de ratón unidos al antígeno. Para la detección, se añadieron 50 μ l de ABTS, sal de 2,2'-azino-bis (ácido 3-etil benzotiazolin-6-sulfónico) diamonio como sustrato. Las placas se analizaron después de 30 minutos a 405 nm usando un instrumento de THERMOMax™ de Molecular Devices. Se seleccionaron clones de hibridoma que secretaban anticuerpos que eran capaces de unirse a IL-7R de ratón para análisis adicional. Estos sobrenadantes de hibridoma positivos se recogieron después de las placas de hibridoma y se ensayaron en ensayos de ELISA frente a Fc humano, IgM de cabra anti rata e IL-7R recombinante humano (rh). Se prepararon después anticuerpos purificados

para los anticuerpos que se unen a IL-7R α rr y anticuerpos que se unen a IL-7R α rr e IL-7R α rh.

Procedimientos generales para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos usando presentación de fagos:

5 Se aislaron anticuerpos humanos anti-IL-7R α humano de una biblioteca de anticuerpos scFv vírgenes humanos de presentación de fagos (Glanville G. y col, 2009, Proc Natl Acad Sci USA, 106(48):20216-20221) por una serie de cuatro ciclos de bio-selección frente a IL-7R α humano (R&D Systems®). Para cada ciclo de selección, se revistió un inmunotubo con 1 ml de IL-7R α (10 μ g/ml en PBS) a 4 °C durante una noche. El inmunotubo revestido con IL-7R α se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 10¹³ fagos (1 ml) al inmunotubo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir la unión. Después de la unión, el inmunotubo se lavó ocho veces con PBST. Se eluyó el fago unido y se usó para infectar células TG1 de nuevo cultivo. Después del cuarto ciclo de selección, se exploraron los positivos para unión frente a IL-7R α humano e IL-7R de ratón mediante ELISA. Los anticuerpos que se unían a IL-7R humano y de ratón se estudiaron adicionalmente con respecto a sus afinidades y función de bloqueo y se seleccionaron anticuerpos para maduración de afinidad.

Ensayo funcional in vitro:

15 Los clones de hibridomas que secretaban anticuerpos de unión a IL-7R humano o de ratón se expandieron y se recolectaron los sobrenadantes. Las IgG totales se purificaron de aproximadamente 10 ml del sobrenadante usando perlas de proteína A, dializadas en tampón de PBS y el volumen final se redujo para producir soluciones con 0,7-1 mg/ml de anticuerpos. Los anticuerpos purificados se usaron después para ensayar su capacidad para bloquear fosforilación de STAT5 mediada por IL-7 en PBMC humanas. Para la preparación de PBMC, se recogieron células de sangre completa a través de gradiente de Ficoll. Las células se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5 % en tubos cónicos (para evitar la adherencia de monocitos/macrófagos) durante 1-2 horas antes de la estimulación con IL-2.

20 Para la exploración funcional, se preincubaron PBMC humanas durante 5 minutos con anticuerpos de ensayo (10 μ g/ml) antes de la adición de IL-7. Se usó un anticuerpo no reactivo de isotipo coincidente como un control negativo (control de isotipo). Las células se estimularon con IL-7 humana (0,1 ng/ml, R&D Systems®) durante 15 minutos. Para detener la estimulación de IL-7, se añadió formaldehído directamente al medio de cultivo hasta una concentración final del 1,6 %. Las células se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió después metanol directamente hasta una concentración final del 80 % y las muestras se almacenaron a 4 °C durante 30 minutos a 1 hora antes de inmunotefirse. Las células se tiñeron con anticuerpos anti-fosfo-STAT5 (p-STAT) (BD Pharmingen, clon 47 de Y694) y anticuerpos anti-CD4 (BD Pharmingen, RPA-T4). Usando citometría de flujo (LSRII, BD™ Biosciences), se analizaron linfocitos CD4⁺ seleccionados con respecto a tinción de p-STAT5. El control de isotipo se estableció como 100 % de p-STAT.

25 La Figura 1 ilustra el efecto de anticuerpos antagonistas de IL-7R monoclonales completamente humanos P2D2 y P2E11 y HAL403a en fosforilación de STAT5 mediada por IL-7 en PBMC humanas. Un anticuerpo monoclonal anti-IL-7R humano de ratón, 13A2F4, se usó como un control positivo y se usó un anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo como un control negativo (control de isotipo). Las PBMC humanas se preincubaron durante 5 minutos con cada uno de los anticuerpos de ensayo o 13A2F4 a las siguientes concentraciones: 0,001; 0,01; 0,1; 1 y 10 μ g/ml. El anticuerpo de control de isotipo se usó a la concentración mayor, 10 μ g/ml. Se estimularon las células con IL-7 humana (0,1 ng/ml) durante 15 minutos, después se fijaron e inmunotefieron como se ha descrito anteriormente.

30 Como se midió mediante tinción de p-STAT5, los anticuerpos humanos P2D2, P2E11, HAL403a, C1GM, C1GM-2 y C2M3 bloquean la señalización mediada por IL-7 humana en una manera dependiente de dosis (Figura 1 y datos no mostrados). El control de isotipo se estableció como 100 % de tinción de p-STAT5. A 10 μ g/ml el anticuerpo HAL403a bloqueó la fosforilación de STAT5 de forma muy eficaz (Figura 1). C1GM, C1GM-2 y C2M3 bloquearon la fosforilación de STAT5 de forma comparable a HAL403a (datos no mostrados).

35 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo antagonista de IL-7R C1GM (SEC ID N° 42) se muestra a continuación.

40 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWVSLVGVWDGFFYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWQGGLTVTVSSASTKYGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQYICNVNHHKPSNTKVDKKAPELLGGPSVFLFPPKPKKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SECID N° 42)

45 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo antagonista de IL-7R C1GM (SEC ID N° 43) se muestra a continuación.

50 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSVYQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTI SGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEC ID N° 43)

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo antagonista de IL-7R C1GM-2 (SEC ID N° 45) se muestra a continuación.

5 EVQLVESGGGLV⁵KPGGSLRLSCAASGFTFDDSV¹⁰MHWVRQAPGKGLEWVSLV¹⁵GW²⁰DGFF²⁵FTYYADSVKGRFTISRDNA³⁰
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF³⁵
EPVTVSWNSGALTS⁴⁰GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV⁴⁵PSSNFGTQTYTCNV⁵⁰DHKPSNTKVDKTVAPPVAGPSVFLFP⁵⁵
PKPKDTLMISRTPEVTCV⁶⁰VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV⁶⁵SVLTVVHQDWLNGKEYK⁷⁰
CKVSNKGLPSSIEKTI⁷⁵SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK⁸⁰TTTPML⁸⁵
DSDGSFFLYSKLTV⁹⁰DKSRWQQGNV⁹⁵FSCSV¹⁰⁰MHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEC ID N° 45)

10 La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo antagonista de IL-7R C1GM-2 (SEC ID N° 43) se muestra a continuación.

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTI
SGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS
PVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSTPEQWKS¹⁵HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEC ID N° 43)

15 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo antagonista de IL-7R HAL403a (SEC ID N° 17) se muestra a continuación.

20 QVNLRESGGGLV⁵KPGGSLRLSCAASGFTFDDSV¹⁰MHWVRQAPGKGLEWVSLV¹⁵GW²⁰DGFF²⁵FTYYADSVKGRFTISRDNT³⁰
KNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF³⁵
EPVTVSWNSGALTS⁴⁰GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV⁴⁵PSSNFGTQTYTCNV⁵⁰DHKPSNTKVDKTVAPPVAGPSVFLFP⁵⁵
PKPKDTLMISRTPEVTCV⁶⁰VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRV⁶⁵SVLTVVHQDWLNGKEYK⁷⁰
CKVSNKGLPSSIEKTI⁷⁵SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK⁸⁰TTTPML⁸⁵
DSDGSFFLYSKLTV⁹⁰DKSRWQQGNV⁹⁵FSCSV¹⁰⁰MHEALHNHYTQKLSLSPGK (SEC ID N° 17)

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo antagonista de IL-7R HAL403a (SEC ID N° 18) se muestra a continuación.

25 NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTI
SGLVTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVLVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV³⁰VCLLN³⁵NFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS⁴⁰TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEC ID N° 18)

Ejemplo 2: Determinación de la Afinidad de Unión del Anticuerpo

Este ejemplo ilustra la determinación de afinidad de unión del anticuerpo con respecto a anticuerpos antagonistas de IL-7R.

30 Las afinidades de los anticuerpos antagonistas de IL-7R para IL-7R humano se midieron en un biosensor de resonancia de plasmón superficial Biacore™ 2000 o 3000 equipado con una microplaca sensora CM5 de uso en investigación (Biacore™ AB, Uppsala, Suecia - ahora GE Healthcare). Se acoplaron con amina fragmentos de F(ab')₂ anti-humanos de cabra policlonales (específicos de Fc) a niveles de saturación en las cuatro celdas de flujo usando una química convencional de N-hidroxisuccinimida/etil dimetilaminopropil carbodiimida (NHS/EDC), en tampón de ejecución de HBS-P (de Biacore™). El tampón se cambió a HBS-P que contenía BSA 1 mg/ml. Se diluyó antígeno de IL-7R-hFc humano [R&D systems, Minneapolis, USA] hasta aproximadamente 30 µg/ml y se capturó durante 3 minutos a 5 µl/minuto para proporcionar niveles de aproximadamente 500-1000 UR por celda de flujo, dejando uno en blanco para servir como canal de referencia. Se inyectaron los formatos Fab, hlgG1 o hlgG2ΔA de los anticuerpos por duplicado como una serie de 5 miembros 3 veces comenzando a 2 µM y una serie de 5 miembros 4 veces comenzando a 0,4 µM durante 3 minutos a 20-50 µl/minuto. Se controló la disociación durante 5 minutos. La microplaca de captura se regeneró después de la última inyección de cada valoración con dos pulsos de 30 segundos de ácido fosfórico 75 mM o glicina-HCl 10 mM pH 1,7. Los ciclos de tampón proporcionaron blancos para la doble referencia de los datos de respuesta de unión, que se ajustaron después globalmente a un modelo de unión reversible simple usando software Biaevaluation v.4.1 para deducir las constantes de velocidad de asociación y disociación cinéticas, respectivamente k_a y k_d . Las afinidades se dedujeron de su relación ($K_D = k_d/k_a$). Los resultados de la Tabla 4 muestran que estos anticuerpos tienen afinidades picomolares o nanomolares para IL-7R humano.

50

Tabla 4

mAb	K _{on} para IL-7R (1/Ms)	K _{off} para IL-7R (1/S)	K _D para IL-7R (nM)
P3A9*	5,60E+04	1,14E-02	204
P4B3*	1,56E+04	3,51E-03	225
P2D2*	7,17E+04	8,82E-04	12
P2E11*	1,55E+05	4,97E-04	3
HAL403a*	5,07E+06	2,86E-04	0,06
HAL403b*	1,39E+06	8,08E-05	0,06
C1GM*	4,85 E+06	1,71E-04	0,04
C1GM**	1,42E+06	4,05E-04	0,286
C1GM-2***	1,51E+06	4,07E-04	0,270
C2M3**	1,41E+06	3,07E-04	0,218
C2M3***	1,55E+06	3,02E-04	0,195

* Fab; ** hIlgG1; ***hIlgG2ΔA

Ejemplo 4: Los Anticuerpos Antagonistas de IL-7R reducen la Incidencia de la Enfermedad en Animales Diabéticos no Obesos (NOD), un Modelo de Ratón para Diabetes Tipo 1

Este ejemplo ilustra el efecto de anticuerpos antagonistas de IL-7R en un modelo de ratón para diabetes tipo 1.

Para estudiar el efecto *in vivo* de anticuerpos antagonistas de IL-7R en el proceso diabetogénico, se ensayó un anticuerpo antagonista de IL-7R de rata anti-ratón, 28G9 (Rinat), en ratones NOD. Los ratones NOD muestran una susceptibilidad a desarrollo espontáneo de diabetes mellitus dependiente de insulina autoinmune (IDDM, diabetes tipo 1) (Kikutani y col, 1992, Adv Immunol 51:285-322). 28G9 bloquea la fosforilación de STAT5 mediada por IL-7- en esplenocitos de ratón y compite de forma cruzada con anticuerpos humanos antagonistas de IL-7R C1GM, C2M3, HAL403a, HAL403b, P3A9, P4B3, P2D2 y P2E11 en Biacore™.

Se inyectó a ratones hembra NOD de 6-8 semanas de edad (The Jackson Laboratory) por vía intraperitoneal (i.p.) semanalmente comenzando a las 9 semanas de edad (t = 0) 3 o 10 mg/kg de peso corporal de 28G9. Se usaron PBS o anticuerpo monoclonal de rata de isotipo coincidente no reactivo (isotipo) como controles negativos. El anticuerpo de isotipo se administró a 10 mg/kg de peso corporal. Se controlaron los ratones dos veces por semana con respecto a peso corporal y glucosa en sangre. La diabetes se consideró establecida cuando el nivel de glucosa en sangre estaba en o por encima de lecturas positivas, es decir, por encima de 250 mg/dl para dos controles consecutivos. La aparición de la diabetes se fechó a partir de la primera de las mediciones secuenciales.

Como se muestra en la Figura 2, ninguno de los ratones tratados con 28G9 a 10 mg/kg desarrolló diabetes incluso a las 18 semanas de edad. Por el contrario, el 75-80 % de los ratones tratados con PBS e isotipo desarrollaron diabetes (Figura 2). Aunque no todos los ratones tratados con 28G9 a 3 mg/kg estuvieron sin diabetes al final del estudio, se observó una incidencia de la diabetes significativamente reducida en comparación con los controles de PBS e isotipo, demostrando que el efecto inhibitorio del 28G9 en el desarrollo de diabetes era dependiente de dosis (Figura 2). El tratamiento con 28G9 a 10 mg/kg redujo significativamente el nivel de glucosa en sangre en comparación con controles de isotipo o PBS (Figura 3A). El desarrollo del ratón durante el tratamiento con el anticuerpo antagonista de IL-7R se controló mediante el seguimiento del peso corporal y la mortalidad. Como se muestra en la Figura 3B, dosificaciones múltiples de 3 o 10 mg/kg de 28G9 no tuvieron efecto significativo en el crecimiento del ratón y no se halló mortalidad a 10 mg/kg. De este modo, los anticuerpos antagonistas de IL-7R reducen los niveles de glucosa en sangre e inhiben la progresión de la diabetes en animales NOD. Estos resultados demuestran que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces en la prevención y ralentización de la progresión de diabetes tipo 1.

Para investigar el efecto de los anticuerpos antagonistas de IL-7R en regulación de linfocitos T periféricos, se inmunotifieron linfocitos T CD4+ y CD8+ para los marcadores de activación CD44 y CD62L y se analizaron mediante citometría de flujo. Se aislaron linfocitos T CD4+ y CD8+ de la sangre periférica de ratones tratados con PBS, tratados con 28G9 o tratados con isotipo. En comparación con el control de isotipo, el porcentaje de linfocitos T CD8+ vírgenes (B220-CD8+CD44^{lo}CD62L^{hi}) en ratones tratados con 28G9 a 10 mg/kg fue significativamente menor y el porcentaje de linfocitos T CD8+ de memoria (B220-CD8+CD44^{hi}CD62L^{hi}) fue significativamente mayor (Figuras 4A y 4B). Por el contrario, los linfocitos T CD4+ vírgenes (B220-CD4+ CD44^{lo}CD62L^{hi}) no se agotaron significativamente en ratones tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R en comparación con control de isotipo (Figura 5). Estos resultados indican que los anticuerpos antagonistas de IL-7R reducen los niveles de glucosa en sangre a través de agotamiento de linfocitos T CD8+ vírgenes.

Ejemplo 5: Los Anticuerpos Antagonistas de IL-7R Retardan la Aparición de Enfermedad Autoinmune

Este ejemplo ilustra el efecto de los anticuerpos antagonistas de IL-7R en un modelo de ratón para esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

El ensayo de activación de STAT5 se usó para identificar anticuerpos antagonistas de IL-7R. Se homogeneizaron bazo de B6 o BALB/c en PBS y se lisaron en tampón de lisis ACK (Invitrogen) durante 2 minutos y después se filtraron a través de una malla de tamaño de poro de 100 μm , se sedimentaron y se resuspendieron a 5×10^6 células/ml a temperatura ambiente en RPMI 1640 a 37 °C que contenía FBS al 10 %, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) y L-glutamina. Se mantuvieron las células a 37 °C en CO_2 al 5 % en tubos cónicos (para evitar adherencia de monocitos/macrófagos) durante 1-2 horas antes de la estimulación. Las células se preincubaron con anticuerpo de ensayo durante 5 minutos antes de la estimulación con IL-7. Las células se trataron durante 15 minutos con IL-7 murina (mIL-7, 0,1 ng/ml). Se añadió formaldehído directamente al medio de cultivo hasta una concentración final del 1,6 % y se fijaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió después metanol directamente hasta una concentración final del 80 % y se almacenaron las muestras a 4 °C durante 30 minutos a 1 hora antes de la inmunotinción. Los siguientes anticuerpos se usaron para inmunotinción: CD11b-FITC (M1/70), B220 Cy5.5PerCP, TCR β -FITC, p-STAT5 (Y694, clon 47)-Alexa 647 (BD™ Pharmingen). Se tiñeron células TCR β + y CD11b+ para fosfo-STAT5. Se observó la fosforilación de STAT5 estimulada con IL-7 mediante selección con TCR β en citometría de flujo. Se identificaron varios anticuerpos que bloqueaban la fosforilación de STAT5, incluyendo los anticuerpos monoclonales 28B6 y 28G9.

Se indujo EAE activa en ratones hembra B6 de 6 a 8 semanas de edad mediante inmunización subcutánea con 100 μg de péptido MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEC ID N° 15)) emulsionado en CFA que contenía 1 mg/ml de H37RA de *Mycobacterium tuberculosis* muerto por calor (Difco) el día 0 (véase, Steinman y Zamvil, 2006). Adicionalmente, los ratones recibieron 400 ng de toxina pertussis (Calbiochem) i.v. en 0,1 ml de PBS los días 0 y 2. Comenzando el día 7 después de la inmunización con MOG, los animales se trataron dos veces por semana con anticuerpo antagonista de IL-7R 28B6 (10 mg/kg), anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9 (10 mg/kg) o anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo (10 mg/kg). Comparado con el control de isotipo, el tratamiento con 28G9 ó 28B6 redujo significativamente la actividad de EAE tan temprano como el día 15 después de la inmunización (Figura 6). Este resultado demuestra que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces en la ralentización de la progresión de EAE.

Para ensayar si los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces de un modo dependiente de dosis, se trataron animales con EAE inmunizados con MOG con 28G9 1 ó 3 mg/kg el día 7 y el día 14 después de la inmunización. Se usó un anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo (1 mg/kg) como control negativo. En comparación con el control de isotipo, el tratamiento con 28G9 en ambos niveles de dosificación redujo la gravedad de EAE en el máximo de la enfermedad (Figura 7). Este efecto inhibitor del anticuerpo antagonista de IL-7R duró aproximadamente una semana. Este resultado demuestra que los anticuerpos antagonistas de IL-7R confieren protección a 1 y 3 mg/kg. En un estudio separado, los animales con EAE inmunizados con MOG se trataron semanalmente con 1, 3 ó 10 mg/kg de 28G9 comenzando el día 7. Los ratones tratados con 28G9 a 1 mg/kg mostraron una eficacia significativa sin mortalidad (Figura 8). Estos resultados demuestran que 1 mg/kg de tratamiento de anticuerpo antagonista de IL-7R es eficaz en la ralentización de la progresión de EAE y se tolera bien.

Para investigar la eficacia del anticuerpo antagonista de IL-7R en enfermedad establecida, se trataron animales con EAE inmunizados con MOG dos veces por semana con 28G9 a 10 mg/kg comenzando el día 14 después de la inmunización. Se usó un anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo (10 mg/kg) como un control negativo. En comparación con el control, el tratamiento con anticuerpo antagonista de IL-7R redujo significativamente la gravedad de EAE (Figura 9). No se observó mortalidad con el anticuerpo antagonista de IL-7R. Este resultado demuestra que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces para mejorar EAE establecida continua.

Para determinar adicionalmente si los anticuerpos antagonistas de IL-7R pueden reducir EAE en intervención tardía a una dosis menor, se trataron los animales con EAE inmunizados con MOG una vez por semana con 28G9 a 3 mg/kg comenzando el día 14 después de la inmunización. Se usó un anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo (3 mg/kg) como un control negativo. En comparación con el control, se observó una reducción altamente significativa de la gravedad de la enfermedad con el tratamiento con anticuerpo antagonista de IL-7R (Figura 10). Este resultado demuestra que el tratamiento con anticuerpo antagonista de IL-7R es eficaz para reducir la actividad de la enfermedad incluso en una intervención tardía y a una dosis menor.

Ejemplo 6: Cambios Inmunológicos Después de la Terapia con Anticuerpo Antagonista de IL-7R en Enfermedad Autoinmune

Este ejemplo ilustra cambios inmunológicos en ratones con EAE después del tratamiento con anticuerpo antagonista de IL-7R.

Para obtener una mejor comprensión de los mecanismos mediante los que actúa el anticuerpo antagonista de IL-7R para mejorar EAE en el modelo de ratón, se analizaron las poblaciones de linfocitos de animales tratados y control mediante inmunotinción y citometría de flujo. Para los estudios inmunológicos en este ejemplo, se trataron animales

con EAE inmunizados con MOG semanalmente con anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9 (10 mg/kg), 28B6 (10 mg/kg) o vehículo (anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo, 10 mg/kg). En estudios seleccionados, se trató a un grupo de animales con EAE inmunizados con MOG semanalmente con 28B6 (10 mg/kg). Se sacrificaron los animales el día 21 después de la inmunización y se recogieron los órganos linfoides centrales. Se prepararon los linfocitos de los órganos y se tiñeron como se describe posteriormente. Los linfocitos inmunoteñidos se analizaron mediante citometría de flujo.

Las poblaciones de linfocitos T en la MO, bazo, sangre y timo de animales con EAE tratados con anticuerpos antagonistas de IL-7R se redujeron significativamente en comparación con controles de vehículo. Como se muestra en la Figura 11, las poblaciones tanto de linfocitos T CD4 (Figura 11A) como de linfocitos T CD8 (Figura 11B) de MO, bazo, sangre y ganglios linfáticos se redujeron significativamente en animales con EAE tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R. Esto es coherente con el papel de IL-7R en el desarrollo de linfocitos T tanto CD4 como CD8. Sin embargo, las poblaciones de linfocitos B no se redujeron significativamente en todos los órganos linfoides periféricos. Este resultado difiere de los datos genéticos de ratón del knockout de IL-7R, que carece de linfocitos T y B.

Debido a que la señalización de IL-7R es crítica para la supervivencia de linfocitos T vírgenes y para la proliferación de linfocitos T de memoria, el efecto de los anticuerpos antagonistas de IL-7R en la regulación de linfocitos T periféricos se analizó mediante inmunotinción usando los marcadores de activación CD44 y CD62L. CD44^{lo}CD62L^{hi} representa linfocitos T vírgenes, CD44^{hi}CD62L^{lo} representa linfocitos T activados y CD44^{hi}CD62L^{hi} representa linfocitos T de memoria. En comparación con animales tratados con vehículo (anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo), los ratones tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R tuvieron poblaciones de linfocitos T vírgenes y linfocitos T activados significativamente agotadas (Figuras 12A y 12C). Sin embargo, las poblaciones de linfocitos T de memoria no se agotaron significativamente (Figura 12B). Este agotamiento selectivo de poblaciones de linfocitos T vírgenes y activados puede proporcionar beneficios en tanto que el agotamiento de linfocitos T vírgenes puede bloquear la activación de linfocitos T específicos de autoAg nacientes, previniendo a su vez EAE. Los linfocitos T de memoria no se agotan y de este modo, la inmunidad anti-infección se conserva.

No se observó una reducción de células NK en animales con EAE tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R. Se observó un ligero aumento en el porcentaje de células NK, presumiblemente debido al porcentaje disminuido de linfocitos T CD4 y CD8. Estos datos son coherentes con la observación de que la señalización de IL-7/IL-7R regula el desarrollo de linfocitos T pero no el de células NK.

Para determinar el efecto del tratamiento con anticuerpo antagonista de IL-7R en la población de linfocitos T_{reg} en animales con EAE, se tiñeron los linfocitos para Foxp3 para identificar linfocitos T_{reg} y tetrámero MOG-MHC de clase II (I-Ab) para detectar linfocitos T específicos de MOG. La población de linfocitos T_{eff} CD4+ específicos de MOG detectada en los ganglios linfáticos de animales con EAE tratados con 28G9 fue similar a la de animales control (tratados con anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo) (Figura 13, gráfica izquierda). Sin embargo, se observó un aumento en la población de linfocitos T_{reg} con el tratamiento de 28G9 (Figura 13, gráfica derecha). Estos resultados demuestran que el tratamiento de animales con EAE con anticuerpo antagonista de IL-7R da como resultado un aumento de la población de linfocitos T_{reg}. De forma ventajosa, el tratamiento con anticuerpo antagonista de IL-7R puede no desarrollar otra enfermedad inflamatoria, un efecto secundario observado con terapia con anticuerpo de IL-2R α .

Preparación de linfocitos y tinción de inmunofluorescencia

Para los estudios anteriores, se generaron suspensiones de leucocitos de célula sencilla de bazo, ganglios linfáticos periféricos (axilares, bronquiales e inguinales emparejados), timo y médula ósea (MO) de fémures bilaterales por disección suave. Se aislaron células mononucleares del sistema nervioso central (SNC) después de perfusión cardiaca con PBS. Brevemente, se digirieron tejidos del SNC con colagenasa D (2,5 mg/ml; Roche Diagnostics) y DNasal (1 mg/ml; Roche Diagnostics) a 37 °C durante 45 minutos. Se aislaron células mononucleares pasando el tejido a través de tamices celulares de 70 μ m (BD Biosciences), seguido de centrifugación en gradiente de Percoll (70 %/37 %). Se recogieron linfocitos del interfaz 37 %/70 % y se lavaron. Los siguientes anticuerpos se usaron para inmunotinción: FITC-, PE- o CD3 conjugado con PE-Cy5 (17A2), CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7), CD62L (MEL14), CD44 (IM7), B220 (H1.2F3), IgM (II/41), DX5 (CD49b) (todos de BD Biosciences). Para tinción con citocinas intracelular, se estimularon los linfocitos *in vitro* con forbol 12-miristato 13-acetato (20 ng/ml; Sigma-Aldrich) e ionomicina (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich) en presencia de GolgiStop™ (monensina) (5 μ g/ml) durante 5 horas antes de la tinción. Se construyó un tetrámero MOG₃₈₋₄₉/IAb y un tetrámero control (CLIP/IAb) y se proporcionaron por el NIH Tetramer Core Facility. Se evaluó la tinción de fondo usando mAb control de isotipo coincidente no reactivos. Para análisis de inmunofluorescencia de 2 ó 3 colores, se tiñeron suspensiones de células sencillas (10⁶ células) a 4 °C usando concentraciones óptimas predeterminadas de mAb durante 20 minutos. Para tinción de tetrámeros, se tiñeron los linfocitos durante 3 horas a 37 °C.

Ejemplo 7: los Anticuerpos Antagonistas de IL-7R Mejoran la Intolerancia a la Glucosa en Animales con Obesidad inducida por Dieta (DIO)

Este ejemplo ilustra el efecto de anticuerpos antagonistas de IL-7R en un modelo de ratón para diabetes tipo 2.

Para estudiar el efecto *in vivo* de los anticuerpos antagonistas de IL-7R en la inflamación adiposa pre-establecida en ratones DIO, se alimentó a ratones macho C57BL/6 (The Jackson Laboratory) con una dieta alta en grasas (HFD, D12492, 60 Kcal % grasas, Research Diets) comenzando a las seis semanas de edad. Después de 10 semanas de dieta alta en grasas, se asignaron aleatoriamente los ratones obesos de 16 semanas a grupos para administración i.p. de anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9 (10 mg/kg), PBS o anticuerpo control de isotipo coincidente no reactivo (10 mg/kg). Cuatro días después del tratamiento con anticuerpos, los ratones se sometieron a un ensayo de tolerancia a la glucosa (i.p. 1 g/kg, después de 16 horas en ayunas) para evaluar la intolerancia a la glucosa. La Tabla 5 muestra el peso corporal medio y los niveles de glucosa para cada uno de los grupos tratados (ratones tratados con PBS, con isotipo o con 28G9). Los animales en cada grupo tenían un peso corporal similar.

10 Tabla 5

Tratamiento	Peso corporal (g)	Glucosa (mg/dl) sin ayuno/con ayuno
PBS	44,4	232/152,6
isotipo	42,3	233/183,6
28G9	41,4	229/122,2

15 Los resultados del ensayo de tolerancia a la glucosa se representan en la Figura 14. La intolerancia a la glucosa inducida por dieta alta en grasa se mejoró mediante tratamiento con anticuerpo antagonista de IL-7R. En el ensayo de tolerancia a la glucosa, los ratones DIO tratados con 28G9 tuvieron unos niveles de glucosa en sangre significativamente más bajos en comparación con ratones tratados con isotipo o PBS (Figura 14). Este resultado demuestra que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces en un modelo animal para diabetes tipo 2.

20 Ejemplo 8: Los anticuerpos Antagonistas de IL-7R Reducen la Gravedad de la Enfermedad en un Modelo de Ratón para Artritis Reumatoide

Este ejemplo ilustra el efecto de anticuerpos antagonistas de IL-7R en un modelo de ratón para artritis reumatoide (AR).

25 La artritis inducida por colágeno (AIC) es un modelo animal ampliamente usado que comparte muchas similitudes patológicas e histológicas con AR. Para estudiar el efecto *in vivo* de anticuerpos antagonistas de IL-7R en AIC, se inmunizaron ratones macho B10.RIII de 6-8 semanas de edad (lote N° 000457, The Jackson Laboratory) con 150 ug de colágeno Tipo II (Elastin Products) emulsionado en adyuvante completo de Freund que contenían 4 mg/ml de H37RA de *Mycobacterium tuberculosis* muertos por calor (Difco) el día 0 y el día 15. Se inyectó a los ratones i.p. 1, 3 ó 10 mg/kg de anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9 o anticuerpos control de isotipo coincidente no reactivo el día -1, día 1, día 8, día 5 y día 22.

30 Se evaluaron las señales clínicas de AIC diariamente con un sistema de puntuación de 0 a 5 puntos: 0, normal; 1, articulación de la pata trasera o delantera afectada o eritema difuso mínimo e hinchazón; 2, articulaciones de la pata delantera o trasera afectadas o eritema difuso suave e hinchazón; 3, articulaciones de la pata delantera o trasera afectadas o eritema difuso moderado e hinchazón; 4, eritema difuso notable e hinchazón; 5, eritema difuso e hinchazón grave de la pata completa, incapaz de flexionar los dedos. El tratamiento con 28G9 a 3mg/kg redujo significativamente la gravedad de AIC en ratones inmunizados con CII en comparación con control de isotipo (Figura 15). El tratamiento con 28G9 a 1 mg/kg no mostró una reducción significativa. Este resultado demuestra que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces en la ralentización de la progresión de la enfermedad en un modelo animal para artritis reumatoide.

40 Ejemplo 9: Los Anticuerpos Antagonistas de IL-7R Reducen la Gravedad de la Enfermedad en un Modelo de Ratón para EAE Establecida

Este ejemplo ilustra la eficacia de un anticuerpo antagonista de IL-7R en un modelo de ratón para EAE establecida.

45 EAE se indujo en ratones SJL/J mediante inmunización con 200 µg de PLP (p139-151) disuelto en adyuvante completo de Freund que contenía 4 mg/ml de H37Ra de *Mycobacterium tuberculosis* muertos por calor (Difco Laboratories). Los ratones se examinaron diariamente con respecto a mediciones de peso corporal y señales clínicas de EAE y se puntuaron como sigue: 0, sin parálisis; 1, pérdida del tono de la cola; 2, debilidad en las extremidades posteriores; 3, parálisis en las extremidades posteriores; 4, parálisis de extremidades posteriores y extremidades anteriores; 5, moribundo o muerto.

50 Los ratones que tienen una puntuación clínica de EAE de 2-3 se trataron con 28G9 (10 mg/kg, i.p.), SB/14 (10 mg/kg, i.p.) o IgG control (10 mg/kg, i.p.) una vez a la semana durante 2 semanas (los días 0, 7 y 14). 28G9 es anticuerpo de rata para IgG1 y SB/14 (BD Biosciences) es un anticuerpo de rata de IgG2a. Las mutaciones clínicas se controlaron diariamente hasta el día 61.

El día 7, los ratones tratados con 28G9 tenían puntuaciones clínicas menores de 2 (N=7). Los ratones tratados con 28G9 mantuvieron puntuaciones clínicas de aproximadamente 2 hasta el fin del estudio (día 61). En comparación, los

animales tratados con IgG control tenían puntuaciones clínicas entre 3 y 4 a lo largo del estudio. No se observó reducción de gravedad de la enfermedad con tratamiento con SB/14 en comparación con el control.

Una reducción altamente significativa de la gravedad de la enfermedad se observó en animales tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9. Estos resultados demuestran que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces en la reducción de la gravedad de la enfermedad en enfermedad autoinmune establecida.

Ejemplo 10: los Anticuerpos Antagonistas de IL-7R Reducen los Niveles de Glucosa en Sangre en Animales con Diabetes de Nueva Aparición

Este ejemplo ilustra la eficacia de los anticuerpos antagonistas de IL-7R en reversión de la diabetes de nueva aparición en un modelo de ratón para diabetes tipo 1.

Se ensayó un panel de anticuerpos antagonistas de IL-7R en un modelo de ratón para diabetes tipo 1. 28G9 es un anticuerpo monoclonal de IgG1 de rata, 28G9-mlgG2a es un anticuerpo que tiene las regiones variables de 28G9 con región constante IgG2a de ratón y agly-28G9 es un anticuerpo aglucosilado que tiene las regiones variables de 28G9 con IgG2a N297a de ratón. Para construcción y expresión de 28G9-mlgG2a, se amplificaron los genes VH y Vk de anticuerpo monoclonal de ratón 28G9 mediante PCR, se clonaron en vectores de expresión de mamíferos kappa de ratón pARC e IgG2a de ratón pARC, y se co-transfectaron en células 293F mediante Lipofectamin™ (Invitrogen™). Después de 5 días después de la transfección, los medios de cultivo se recolectaron y se purificó IgG2a de ratón 28G9 mediante el uso de resina Mabselect™ (GE). Para la construcción y expresión de agly-28G9, se clonó la VH de 28G9 de rata en un vector de IgG2a de ratón pARC modificado por ingeniería genética en el que se reemplazó Asn-297 del dominio CH2 con Ala (N297A de IgG2a de ratón pARC). Se obtuvo un m28G9 aglucosilado (agly-28G9) por co-transfección de células 293F con N297A de IgG2a de ratón pARC y vector kappa de ratón 28G9 pARC.

Se trató a los ratones NOD diabéticos de nueva aparición espontáneos (es decir, dos concentraciones de glucosa en sangre consecutivas por encima de 250 mg/dl) i.p. semanalmente con 28G9-mlgG2a (10 mg/kg, i.p.), 28G9 (10 mg/kg, i.p.), agly-28G9 (10 mg/kg, i.p.) o IgG control (10 mg/kg, i.p.). Los niveles de glucosa en sangre se controlaron diariamente durante 140 días después de la aparición de la enfermedad. En ratones tratados con 28G9-mlgG2a, se observó una remisión del 100 %. En los ratones NOD tratados con 28G9-mlgG2a, los niveles de glucosa en sangre se mantuvieron por debajo de 250 mg/dl con inyecciones semanales de 28G9-mlgG2a. 28G9 también mostró algo de eficacia en la reducción de los niveles de glucosa en sangre en comparación con IgG control. Los ratones tratados con agly-28G9 y los ratones tratados con IgG tuvieron niveles de glucosa en sangre de más de 250 mg/dl a lo largo del estudio. Estos resultados demuestran que el anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9-mlgG2a es altamente eficaz en la reducción de los niveles de glucosa en sangre en ratones con diabetes de tipo 1 establecida.

En un estudio separado, se trató a los ratones NOD diabéticos de nueva aparición espontáneos semanalmente, comenzando en la aparición de la enfermedad, con 28G9-mlgG2a (10 mg/kg i.p.) para el número de dosis indicado en la Tabla 6. Los niveles de glucosa en sangre se controlaron diariamente.

Tabla 6

Ratón	Edad en la aparición de la enfermedad (días)	Nº total de dosis	Días sin diabetes
1	140	3	117
2	190	2	89
3	210	3	145

Los resultados mostrados en la Tabla 6 indican que dos dosis de anticuerpo antagonista de IL-7R fueron suficientes para mantener los niveles de glucosa en sangre por debajo de 250 mg/dl durante hasta 89 días. Tres dosis de anticuerpo antagonista de IL-7R fueron suficientes para mantener los niveles de glucosa en sangre por debajo de 250 mg/dl durante al menos 117 días. En este estudio, los niveles de glucosa en sangre mantenidos a menos de 250 mg/dl se observaron hasta cinco meses después del tratamiento con anticuerpo antagonista de IL-7R.

Los resultados de los estudios descritos anteriormente demuestran que el anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9-mlgG2a era altamente eficaz en la reducción de los niveles de glucosa en sangre en animales con diabetes de nueva aparición. Además, los ratones tratados con solamente dos o tres dosis de anticuerpos antagonistas de IL-7R mantuvieron niveles de glucosa en sangre por debajo de 250 mg/dl durante varios meses después de que se administrara el anticuerpo.

Ejemplo 11: Los Anticuerpos Antagonistas de IL-7R Reducen la Gravedad de la Enfermedad en Modelos de ratón para Enfermedad de Injerto contra Huésped (GVHD)

Este ejemplo ilustra el efecto de los anticuerpos antagonistas de IL-7R en modelos de ratón para enfermedad de injerto contra huésped aguda y crónica (GVHD).

GVHD aguda

Para modelo de ratón de GVHD aguda, se inyectaron 10×10^6 PBMC humanas (recién aisladas) en ratones NOD.SCID IL2R $\gamma^{-/-}$ no irradiados (The Jackson Laboratory, 8-12 semanas de edad). 14 días después de la inyección, los ratones se trataron con anticuerpo antagonista de IgG1 completamente humano de IL-7R HAL403b (n=10) o control de isotipo (n=10) 10 mg/kg una vez por semana. Las señales clínicas de GVHD y el peso corporal se controlaron dos veces por semana. Cuarenta días después del tratamiento, el 100 % de los animales tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R permanecían vivos, a diferencia de solamente el 50 % de animales tratados con el control de isotipo que sobrevivieron. Este resultado indica que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces para reducir la tasa de mortalidad en un modelo animal para GVHD aguda.

GVHD crónica

Para el modelo de ratón de GVHD crónica, se trasplantaron células de sangre de cordón umbilical humanas que contenían un pequeño porcentaje (1-5 %) de linfocitos T CD3+ en ratones neonatos irradiados NOD.SCID IL2R $\gamma^{-/-}$. Brevemente, se agotaron los linfocitos T CD3+ de sangre de cordón umbilical CD34+ humana (AllCells, LLC, Emeryville, CA) usando perlas de selección CD3 humanas (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania, CAT N° 130-050-101). Para el trasplante, se inyectaron aproximadamente de 300.000 a 400.000 células CD34+ que contenían aproximadamente del 1 al 5 % de linfocitos T CD3+ (en un volumen de 50 μ l) por vía intracardiaca por ratón neonato irradiado NOD.SCID IL2R $\gamma^{-/-}$ (The Jackson Laboratory). cGVHD se desarrolló 16-20 semanas después del trasplante.

Comenzando a las 24 semanas de edad, se inyectó a los ratones con cGVHD anticuerpo antagonista de IgG1 completamente humano de IL-7R HAL403b (n=4) o PBS (n=4) 10 mg/kg, una vez por semana hasta el sacrificio.

Los ratones se sacrificaron aproximadamente a las 28-32 semanas de edad, después de aproximadamente de 4 a 8 semanas de tratamiento con anticuerpo antagonista de IL-7R o PBS. Los ratones tratados con anticuerpo antagonista de IgG1 completamente humano de IL-7R tuvieron una pérdida de pelo significativamente menor que los ratones inyectados con PBS. Los análisis histológicos mostraron que los riñones de ratones tratados con PBS generalmente estaban afectados de forma más grave que los riñones de ratones tratados con anticuerpos antagonistas de IL-7R. Por ejemplo, los riñones de ratones control (tratados con PBS) tenían bucles capilares marcadamente engrosados con cantidades aumentadas de material eosinófilo. Por el contrario, los riñones de ratones tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R tenían bucles capilares suavemente engrosados con cantidad aumentada de material eosinófilo. Además, los riñones de ratones tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R tuvieron menos túbulos dilatados en comparación con riñones de ratones tratados con control de isotipo, que mostraron muchos túbulos dilatados. La histología de pulmón reveló tejido linfoide asociado con bronquios (BALT) sustancialmente reducido en pulmones de ratones tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R en comparación con pulmones de ratones control, que tenían algo de BALT presente. Se observó una atrofia linfoide grave en bazo de ratones tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R, en comparación con el cambio de suave a moderado en el bazo de ratones tratados con PBS.

Estos resultados indican que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces en la reducción de la gravedad de la enfermedad en un modelo animal para GVHD crónica.

Ejemplo 12: Los Anticuerpos Antagonistas de IL-7R Reducen la Gravedad de la Enfermedad en un Modelo de Ratón para Lupus

Este ejemplo ilustra el efecto de los anticuerpos antagonistas de IL-7R en un modelo de ratón para lupus.

Para el modelo de ratón de lupus, se usaron ratones MRL/MPJ-Fas^{lpr}/J (The Jackson Laboratory). Comúnmente denominados mutantes *lpr*, estos ratones son homocigotos para la mutación espontánea de linfoproliferación (Fas^{lpr}) y muestran autoinmunidad sistémica, linfadenopatía masiva asociada con proliferación de linfocitos T aberrantes, artritis y glomerulonefrosis compleja inmune. Como tal, los ratones MRL/MpJ-Fas^{lpr}/J son útiles como un modelo para el lupus sistémico eritematoso.

Comenzando en el momento de aparición de la enfermedad, se administró a los ratones i.p. semanalmente 1, 3 ó 10 mg/kg de anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9-mIgG2a (véase Ejemplo 10), anticuerpo antagonista de IL-7R agly-28G9 1 mg/kg, un IgG control de isotipo (control negativo) o ciclofosfamida (control positivo). Para cada grupo de tratamiento, se usaron diez ratones (n=10). Se controló la gravedad de la enfermedad mediante la medición de niveles de proteinuria, niveles de actividad y evaluación del reflejo de enderezamiento. Al evaluar el reflejo de enderezamiento, los ratones que no se enderezaron en un período de 30 segundos se sacrificaron. La tasa de supervivencia se resume en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Tratamiento	Tasa de supervivencia a las 8 semanas después de la aparición de la enfermedad	Tasa de supervivencia a las 12 semanas después de aparición de la enfermedad
28G9-mlgG2a 1 mg/kg	60 %	50 %
28G9-mlgG2a 3 mg/kg	80 %	70 %
28G9-mlgG2a 10 mg/kg	90 %	80 %
agly-28G9 1 mg/kg	100 %	100 %
IgG control de isotipo (control negativo)	60 %	60 %
Ciclofosfamida (control positivo)	80 %	80 %

Como se muestra en la Tabla 7, los ratones tratados con agly-28G9 1 mg/kg, 28G9-mlgG2a 3 mg/kg o 28G9-mlgG2a 10 mg/kg tuvieron una tasa de supervivencia aumentada en comparación con ratones tratados con IgG control de isotipo. Estos resultados indican que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces en la reducción de la gravedad de la enfermedad en un modelo animal para lupus.

15 Ejemplo 13: Mapeo de Epítomos/Unión de Anticuerpos Antagonistas de IL-7R

Este ejemplo ilustra mutagénesis guiada por estructura para mapear los epítomos de unión al anticuerpo.

Basándose en la estructura cristalina del complejo IL-7/IL-7R α y la probable implicación de ciertos restos en unión de IL-7 (McElroy y col., 2009, Structure, 17 (1):54-65), se seleccionaron veintitrés mutantes de restos superficiales de IL-7R α (N29D, V58S, E59R, R66N, K77S, L80S, I82S, K84S, K100S, T105A, N131S, Q136K, K138S, Y139F, K141S, M144A, D190S, H191N, Y192A, Y192F, K194S, K194A y F196S) para mutación para mapear los epítomos de unión a anticuerpo. La numeración de los mutantes (es decir, N29D, V58S, E59R, etc.) sigue la convención de proteína post-procesamiento en la que no se cuentan los primeros 20 aminoácidos.

Un panel de mutantes puntuales de IL-7R α (marcados con his) se preparó como sigue. Los veintitrés mutantes puntuales de IL-7R α descritos anteriormente se generaron a partir de la construcción de ADN de tipo silvestre descrita anteriormente (McElroy y col., 2009, mencionada anteriormente) usando técnicas de ADN convencionales. Las proteínas mutantes se expresaron usando transfección transitoria en células HEK293T y se secretaron a los medios celulares. Las proteínas mutantes se purificaron mediante cromatografía en columna de Ni²⁺. Las concentraciones de proteínas se midieron mediante espectrofotometría (NanoDrop™).

Se realizó un análisis de interacción de IL-7R α a 25 °C usando un biosensor XPR36 de ProteOn™ basado en resonancia de plasmón superficial equipado con una microplaca sensora GLM (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos). Se usó tampón de ejecución HBST (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05 % v/v) en todo el ensayo. Los anticuerpos de IL-7R de longitud completa (HAL403a o HAL403b) se acoplaron con amina en canales "verticales" separados de la microplaca mediante química mediada por EDC/sulfo-NHS convencional hasta niveles de aproximadamente de 2000-5000 UR. El panel de mutantes de IL-7R α (incluyendo IL-7R α de tipo silvestre) se exploró en la dirección "horizontal" a 100 nM usando fases de asociación y disociación de 3 y 10 minutos respectivamente a 30 μ l/minuto. Se regeneraron superficies con tampón de elución inmunopuro Pierce 2/1 v/v (pH 2,8)/NaCl 4M. La mayoría de las inyecciones se duplicaron para confirmar que el ensayo era reproducible.

La Tabla 8 resume el impacto de las mutaciones puntuales en los mutantes de IL-7R α sobre la unión de anticuerpos en comparación con IL-7R α de tipo silvestre.

Tabla 8

Mutante de IL-7R α	Impacto sobre la unión de anticuerpos (HAL403a o HAL403b)
I82S	Altamente alterado
K84S, K100S, T105A, Y192A	Alterado
D190S, H191N, K194S	Ligeramente alterado
N29D, V58S, E59R, R66N, K77S, L80S, N131S, Q136K, K138S, Y139F, K141S, M144A, Y192F, K194A, F196S, (tipo silvestre)	Ninguno

- 5
- 10 Los mutantes de IL-7R α que presentan unión de anticuerpos debilitada en comparación con IL-7R α de tipo silvestre se identificaron con una mutación puntual en un resto implicado en la unión de mAb. Los restos de unión de IL-7R α al anticuerpo HAL403a en orden descendiente de efectos mutantes se identificaron como sigue: I82 (alto impacto en la unión), K84 (impacto medio), K100 (impacto medio), T105 (impacto medio), Y192 (impacto medio), D190 (impacto pequeño), H191 (impacto pequeño) y K194 (impacto pequeño). Los restos de unión de la IL-7R α con el anticuerpo HAL403b en orden descendiente de efectos mutantes se identificaron como sigue: I82 (impacto alto en la unión), K84 (impacto medio), K100 (impacto medio), T105 (impacto medio), Y192 (impacto medio), D190 (impacto pequeño), H191 (impacto pequeño) y K194 (impacto pequeño).
- 15

Listado de secuencias

- <110> Corporación Rinat Neuroscience
- 20
- <120> ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI-RECEPTOR DE IL-7 Y PROCEDIMIENTOS
- <130> PC33990A
- 25
- <140> 61/438,205
- <141> 2011-01-31
- <150> 61/307,670
- <151> 2010-02-24
- 30
- <160> 61
- <170> Patent In versión 3.5
- 35
- <210> 1
- <211> 111
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 40
- <400> 1

ES 2 780 374 T3

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser
 20 25 30

5 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Asn Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

10 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80

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

Ser His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Cys
 100 105 110

15 <210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser

25

30

35

ES 2 780 374 T3

20 25 30

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

5 Ser Leu Val Gly Trp Asp Gly Ser Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

15

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Arg Ile Ala Ser Ser
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Thr Val
35 40 45

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

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

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

Ser Ser Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Ser
100 105 110

ES 2 780 374 T3

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 4

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

10

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

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

15

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

20

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

Ala Arg Asp Ile Ser Gly Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

25

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

30

<213> Homo sapiens

<400> 5

35

ES 2 780 374 T3

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser
 20 25 30

5

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Asn Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

10

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80

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

15

Ser His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Cys
 100 105 110

<210> 6

<211> 117

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 6

25

30

35

ES 2 780 374 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser
 20 25 30

5

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

Ser Leu Val Gly Trp Asp Gly Phe Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

10

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

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

15

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

20

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 7

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser
 20 25 30

30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Asn Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

35

ES 2 780 374 T3

	50		55		60														
	Gly	Ser	Ile	Asp	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly			
	65					70				75					80				
5	Leu	Val	Thr	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Phe			
					85					90					95				
	His	His	Leu	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Cys				
				100					105					110					
	<210>	8																	
10	<211>	117																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Homo sapiens																	
	<400>	8																	
15	Gln	Val	Asn	Leu	Arg	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly			
	1				5					10					15				
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Ser			
				20					25					30					
20	Val	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu			
			35				40						45						
	Ser	Leu	Val	Gly	Trp	Asp	Gly	Phe	Phe	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val			
	50						55						60						
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu	Tyr			
	65					70					75					80			
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
				85						90					95				
	Ala	Arg	Gln	Gly	Asp	Tyr	Met	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu			
				100					105					110					
30	Val	Thr	Val	Ser	Ser														
				115															
	<210>	9																	
	<211>	111																	
	<212>	PRT																	
35	<213>	Homo sapiens																	
	<400>	9																	

ES 2 780 374 T3

1 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
 5 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser
 10 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Asn Ser Pro Thr Thr Val
 15 Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 20 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 25 Leu Val Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Phe
 30 His His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Cys
 35 <210> 10
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 10
 45 Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser
 55 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 60 Ser Leu Val Gly Trp Asp Gly Phe Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 65 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Leu Leu Tyr
 70 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 75 Ala Arg Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 80 Val Thr Val Ser Ser
 85 115

ES 2 780 374 T3

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 11

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

10

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Asn Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

15

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

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

20

His His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Cys
100 105 110

<210> 12

<211> 117

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<400> 12

30

35

ES 2 780 374 T3

Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser
 5 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ser Leu Val Gly Trp Asp Gly Phe Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 10 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Leu Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 15 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 20 115
 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido de enlace
 30 <400> 13
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 <210> 14
 <211> 351
 35 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 780 374 T3

<400> 14

5 caggtcaact taagggagtc tgggggaggc ctggtcaagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattctgtca tgcactgggt ccgtcaagct 120
 ccggggaagg gtctggagtg gctctctctt gttgggtggg atggtttttt tacatactat 180
 gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acaccaagaa cttactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacaaggg 300
 gattacatgg ggaacaactg gggccagga accctgggtca ccgtctctc a 351

<210> 15

10 <211> 333

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

15 aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcgggggtctc cgggaaagac ggtgaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtgg cagcattgac agttcctatg tgcagtggta ccagcagcgc 120
 ccgggcaatt cccccaccac tgtgatctat gaggatgacc aaagaccctc tggggtcctt 180
 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
 20 ctggtgactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtctt atgattttca tcatctgggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta tgt 333

<210> 16

<211> 15

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de enlace

30

<400> 16

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 17

35 <211> 431

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 780 374 T3

<400> 17

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

30

35

ES 2 780 374 T3

Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 210 215 220

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 225 230 235 240

5

 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 245 250 255

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 260 265 270

10

 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 275 280 285

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 290 295 300

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 305 310 315 320

15

 Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 325 330 335

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 340 345 350

20

 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 355 360 365

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 370 375 380

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 385 390 395 400

25

 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 405 410 415

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 420 425 430

30

 <210> 18
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

 <400> 18

ES 2 780 374 T3

1 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Lys
 5 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser
 10 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Asn Ser Pro Thr Thr Val
 15 Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 20 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 25 Leu Val Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Phe
 30 His His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Thr Val
 35 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 40 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 45 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 50 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 55 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 60 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 65 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 70 210 215

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 19

ES 2 780 374 T3

Asp Ser Val Met His
1 5

<210> 20

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Asn Tyr Gly Met His
1 5

10

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 21

Leu Val Gly Trp Asp Gly Ser Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

20

Gly

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 22

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

30

Gly

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 23

ES 2 780 374 T3

Leu Val Gly Trp Asp Gly Phe Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 24

Gln Gly Asp Tyr Val Phe Asp Tyr
1 5

<210> 25
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

20 Asp Ile Ser Gly Gly Gly Met Asp Val
1 5

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 26

30 Gln Gly Asp Tyr Val Phe Asn Asn
1 5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 27

ES 2 780 374 T3

Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asp Tyr
1 5

<210> 28

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asn Asn
1 5

10

<210> 29

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 29

Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser Tyr Val Gln
1 5 10

20

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 30

Thr Gly Ser Ser Gly Arg Ile Ala Ser Ser Tyr Val Gln
1 5 10

30

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

35

Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

ES 2 780 374 T3

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 32

Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 33

10

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

15

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser His Leu Val
1 5

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gln Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Leu Trp Val
1 5 10

25

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 35

Met Gln Tyr Asp Ser Ser His Leu Val
1 5

<210> 36

<211> 9

35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 780 374 T3

<400> 36

Gln Ser Tyr Asp Phe His His Leu Val
1 5

<210> 37

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

10 Met Gln Tyr Asp Phe His His Leu Val
1 5

<210> 38

<211> 351

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 38

gaggtccagt tagtggagtc tgggggaggc ctgggtcaagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattctgtca tgcactgggt ccgtcaagct 120
20 ccggggaagg gtctggagtg ggtttctctt gttggttggg atggtttttt tacatactat 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acggaagaa ctctctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacaaggg 300
gattacatgg ggaacaactg gggccagggg accctgggtca ccgtctcctc a 351

25 <210> 39

<211> 330

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 39

30 aatthttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggaatctc cgggaaagac ggtgaccatc 60
tcctgcaccc gcagcagtgg cagcattgac agttcctatg tgcagtggta ccagcagcgc 120
ccgggcagct ccccaccac tgtgatctat gaggatgacc aaagaccctc tggggtccct 180
gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
35 ctgaaaactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtctt atgattttca tcatctggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

ES 2 780 374 T3

<210> 40

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 40

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

10

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser
20 25 30

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

15

Ser Leu Val Gly Trp Asp Gly Phe Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

20

Ala Arg Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41

25

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

30

35

ES 2 780 374 T3

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser
 20 25 30

5

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

10

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80

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

15

His His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 42

<211> 432

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 42

25

30

35

ES 2 780 374 T3

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 245 250 255
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 260 265 270
 5 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 275 280 285
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 290 295 300
 10 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 305 310 315 320
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 325 330 335
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 340 345 350
 15 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 355 360 365
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 370 375 380
 20 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 385 390 395 400
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 405 410 415
 25 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 420 425 430

<210> 43

<211> 215

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 43

35

ES 2 780 374 T3

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser
 20 25 30
 5 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45
 Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 10 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Phe
 85 90 95
 15 His His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gln Pro
 100 105 110
 Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
 115 120 125
 20 Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
 145 150 155 160
 25 Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
 165 170 175
 Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
 180 185 190
 30 Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
 195 200 205
 Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 44

<211> 110

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 780 374 T3

<400> 44

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser
 20 25 30

5

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
 35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

10

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Gln Tyr Asp Phe
 85 90 95

15

His His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 45

<211> 431

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 45

25

30

35

ES 2 780 374 T3

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser
1 5

<210> 47

10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

15

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser Val Met His
1 5 10

<210> 48

<211> 6

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gly Trp Asp Gly Phe Phe
1 5

25

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 49

Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asn Asn
1 5

<210> 50

35

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Asp o Asn

10
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Ser o Tyr

<400> 50

Xaa Xaa Val Met His

1

5

15
 <210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser Leu o Ala

25
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Val o Ile

30
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser Gly o Ser

35
 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser Trp o Gly

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

5 <222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser Asp o Ser

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

10 <222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser Phe, Gly o Ser

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

15 <222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser Phe, Ala o Ser

<400> 51

20	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5					10					15	

Gly

<210> 52

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

30 <222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser Gln o Asp

<220>

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

35 <222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser Gly o Ile

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (3)..(3)
<223> Xaa puede ser Asp o Ser

5

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser Tyr o Gly

10

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Met, Val o Gly

15

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser Gly o Phe

20

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser Asn, Asp o Met

25

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (8)..(8)
<223> Xaa puede ser Asn, Tyr o Asp

30

<400> 52

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 53
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Arg o Gly
 5

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa puede ser Ser o Arg
 10

<220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser Asp o Ala
 15

<400> 53
 Thr Xaa Ser Ser Gly Xaa Ile Xaa Ser Ser Tyr Val Gln
 1 5 10

20 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> MISC_CHARACTERÍSTICA
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser Asp o Asn

30 <400> 54
 Glu Asp Xaa Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 55
 <211> 9
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser Gln o Met
5

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (2)..(2)
<223> Xaa puede ser Ser o Gln
10

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser Asp o Ala
15

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Phe o Ser
20

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (6)..(6)
<223> Xaa puede ser His o Ser
25

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser His o Ser
30

<220>
<221> MISC_CHARACTERÍSTICA
<222> (9)..(9)
<223> Xaa puede ser Val o Trp
35

<400> 55

Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
1 5

ES 2 780 374 T3

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 56
Phe Thr Phe Asp Asp Ser Val Met
1 5
<210> 57
10 <211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 57
15 Gly Trp Asp Gly Phe Phe
1 5
<210> 58
<211> 6
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (3)..(3)
25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (4)..(4)
30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (5)..(5)
35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
<220>

ES 2 780 374 T3

<221> MISC_CHARACTERÍSTICA

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

5 <400> 58

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 59

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

15 Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser Tyr
1 5

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 60

Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val
1 5

<210> 61

25 <211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

30 Phe His His Leu
1

REIVINDICACIONES

- 1 Un anticuerpo aislado que se une específicamente a receptor de interleucina 7 alfa (IL-7R α), en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende los restos I82, K84, K100, T105 y Y192 del receptor de interleucina 7 alfa humano (IL-7R α), y en el que el anticuerpo se compone:
- 5 una región variable de cadena ligera (VL) que comprende un VL CDR1 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:29, un VL CDR2 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:31, y un VL CDR3 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:36; y una de:
- 10 (i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende un VH CDR1 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:19, un VH CDR2 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:23, y un VH CDR3 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:28; o
- (ii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende un VH CDR1 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:46, un VH CDR2 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:48, y un VH CDR3 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:49; o
- 15 (iii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende un VH CDR1 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:47, un VH CDR2 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:23, y un VH CDR3 con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:49,
- en el que la afinidad de unión (KD) del anticuerpo con la IL-7R humana es menor de 500pM.
- 2 El anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 1, en el que
- 20 (i)La región VH comprende la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:40 y la región VL comprende la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:41; o
- (ii)La región VH comprende la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:10 y la región VL comprende la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:9; o
- 3 El anticuerpo como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el anticuerpo comprende además una región constante.
- 25 4 El anticuerpo, como se reivindica en la reivindicación 23, en el que la región constante del anticuerpo es de la subclase IgG1 humana o IgG2 Δ a, en la que IgG2 Δ a es una IgG2 humana que contiene la mutación A330P331 a S330S331, en la que los residuos de aminoácidos están numerados con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo silvestre.
- 30 5 El anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.
- 6 El anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo comprende una cadena ligera con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:43 y una cadena pesada con la secuencia aminoacídica que se muestra en la SEQ ID NO:42, con o sin la lisina C-terminal de la SEQ ID NO:42.
- 35 7 El anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que epítipo comprende además uno o más restos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los restos D190, H191 y K194 de IL-7R α humano.
- 8 Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 9 Una línea celular que produce de forma recombinante el anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 10 Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 11 Una composición farmacéutica para el uso en tratar y/o prevenir un trastorno autoinmune en un individuo, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el trastorno autoinmune se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus y esclerosis múltiple.
- 45 12 Una composición farmacéutica para el uso en tratar y/o prevenir la diabetes tipo 2 en un individuo, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 13 Una composición farmacéutica para el uso en tratar y/o prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD)

en un individuo, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

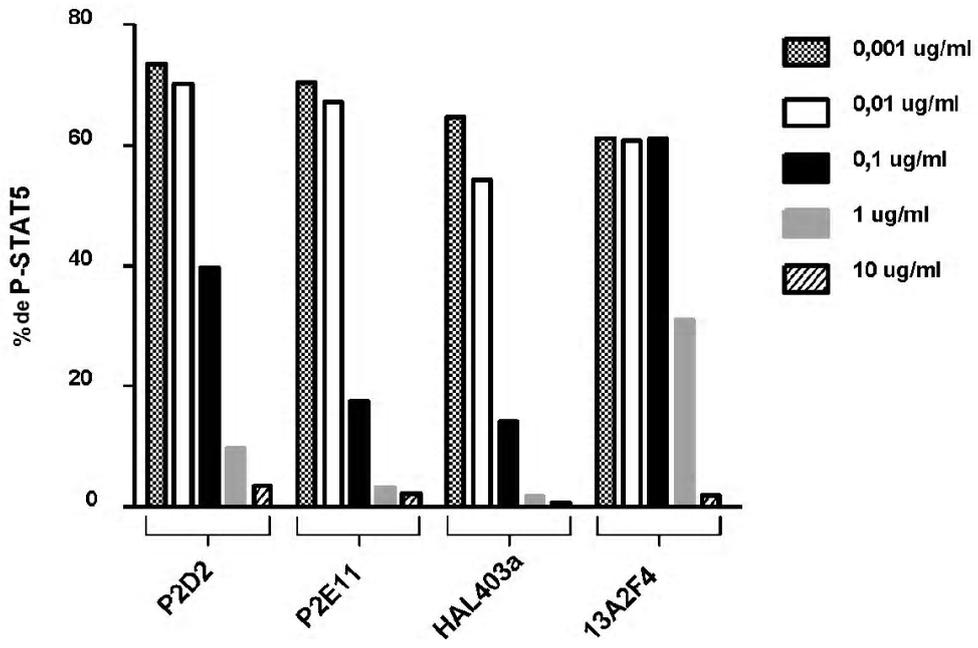


Figura 1

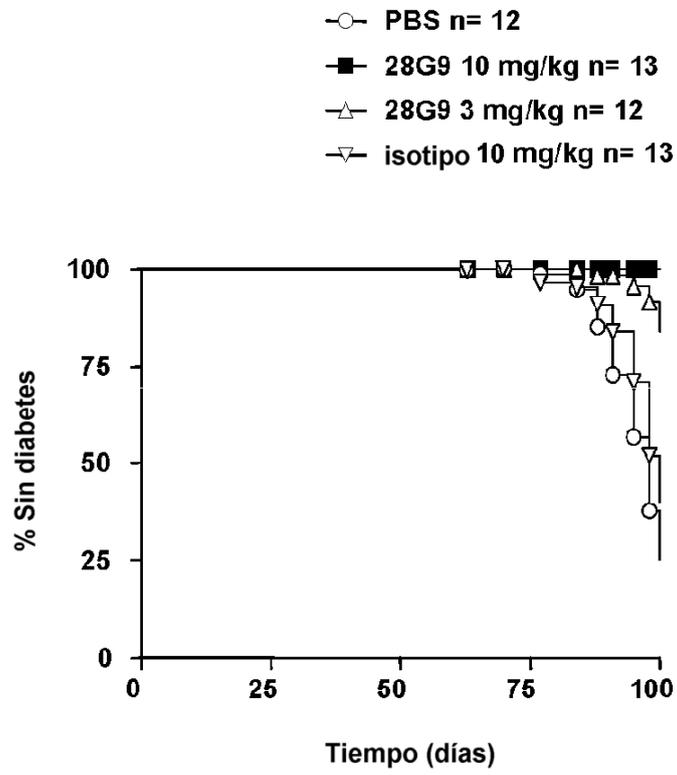


Figura 2

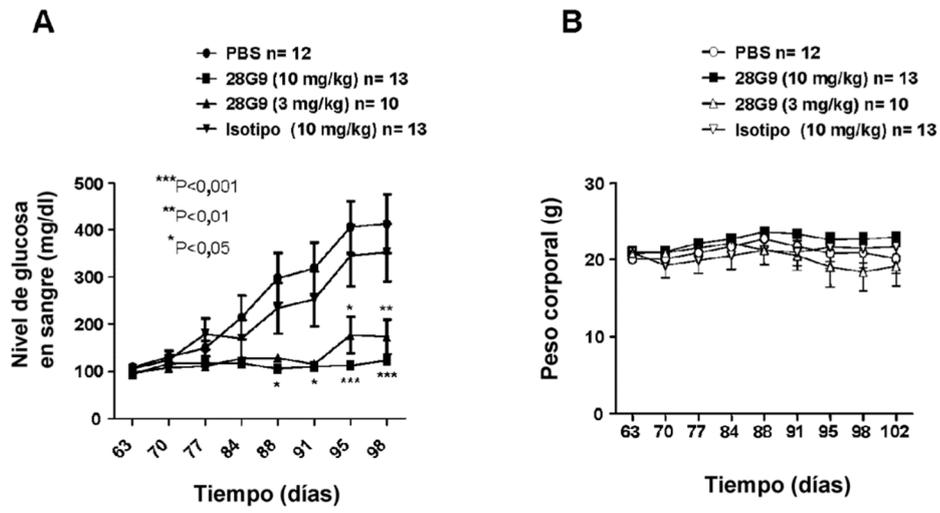


Figura 3

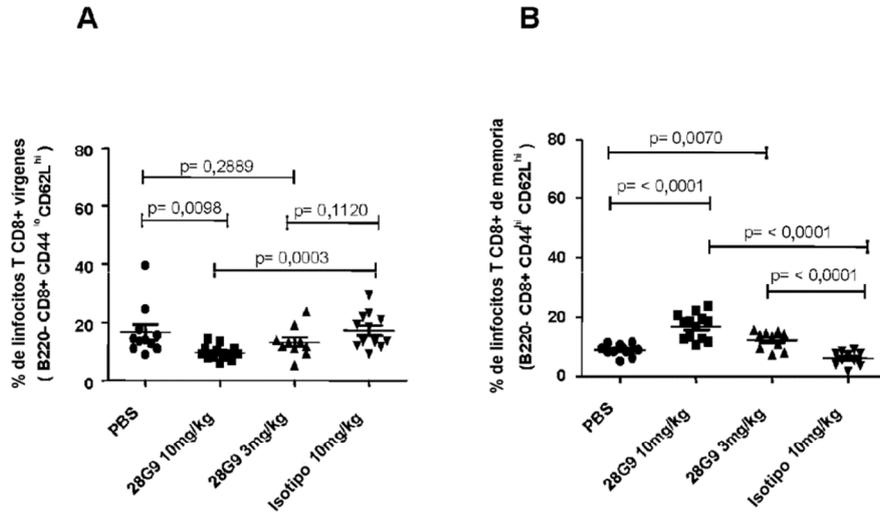


Figura 4

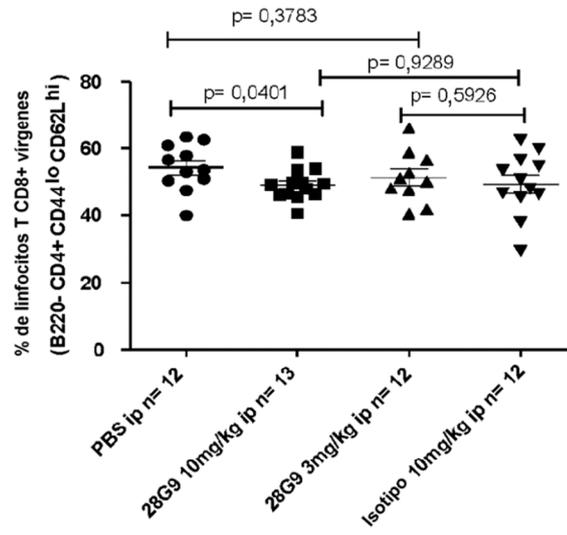


Figura 5

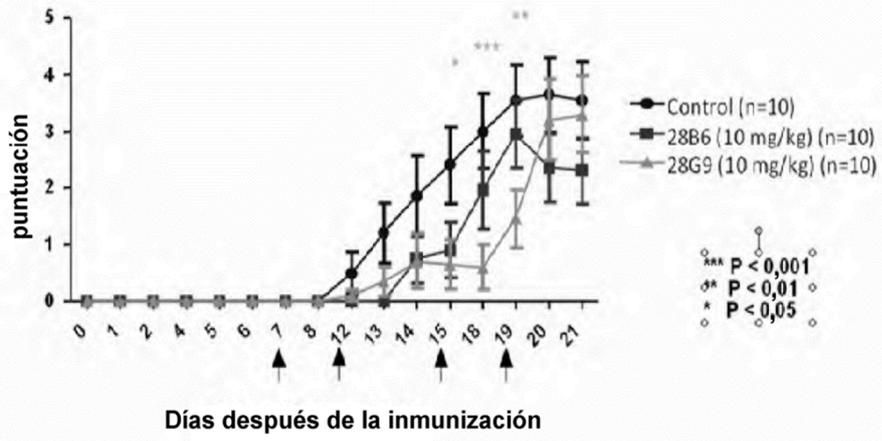


Figura 6

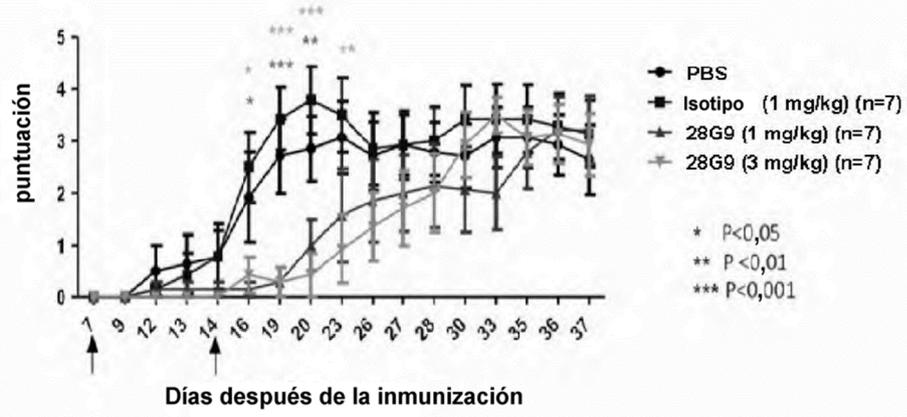
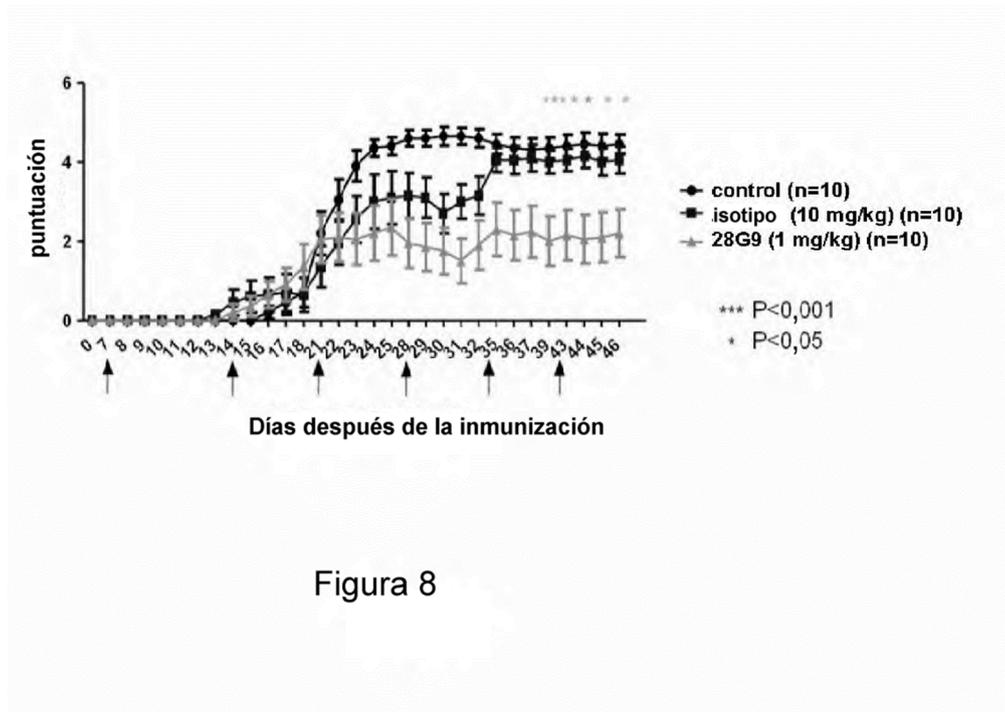


Figura 7



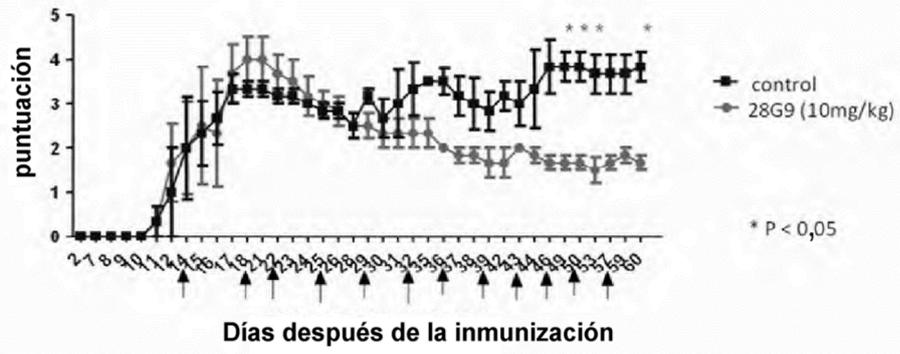


Figura 9

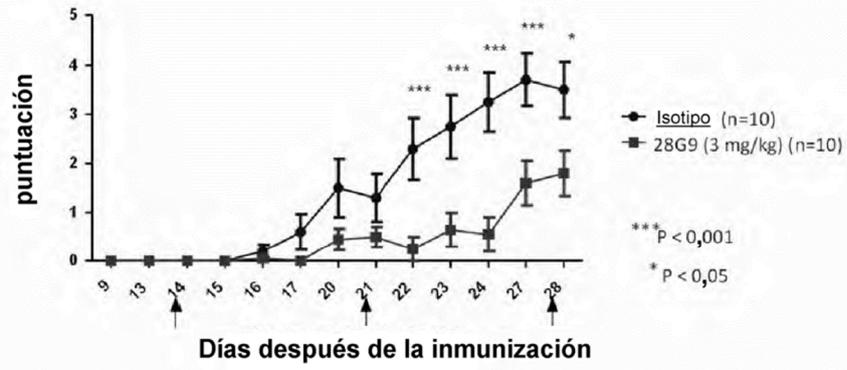


Figura 10

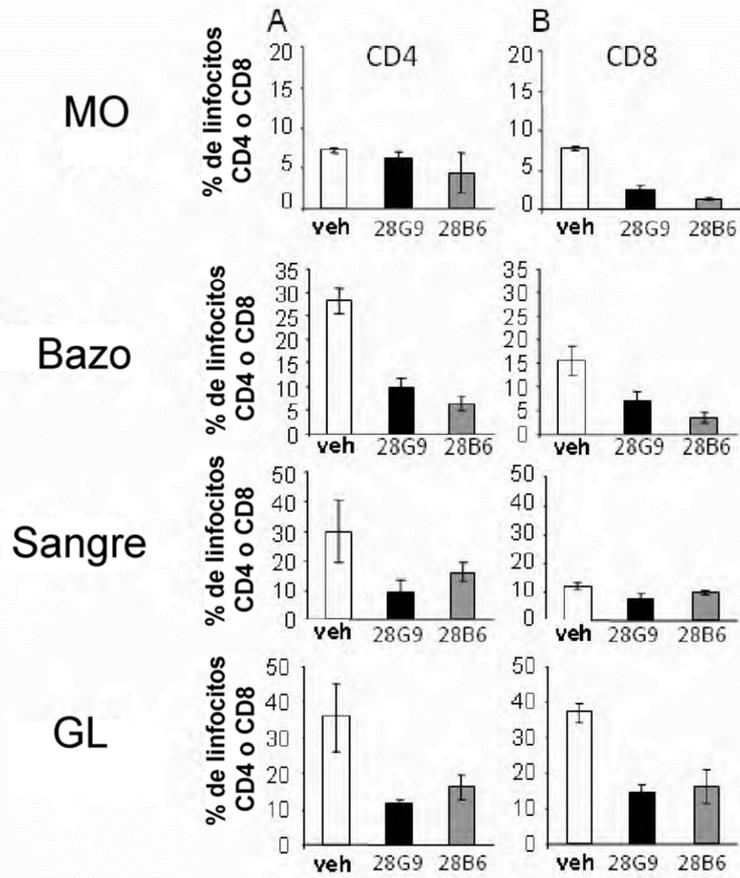


Figura 11

Figura 12A

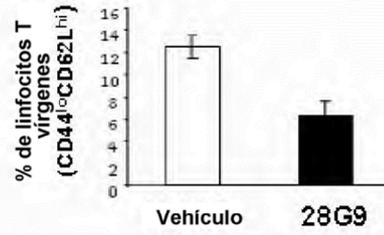


Figura 12B

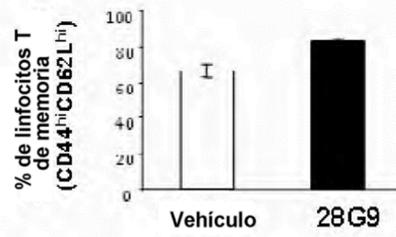
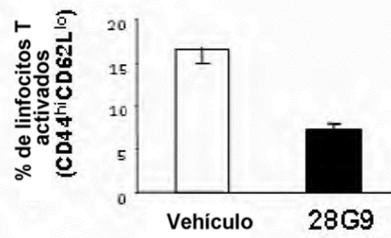


Figura 12C



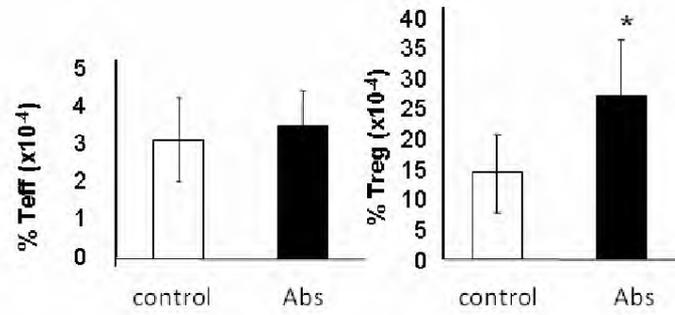


Figura 13

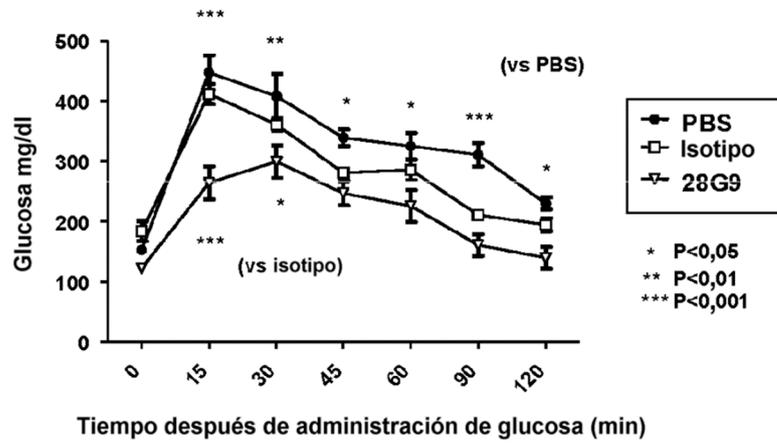


Figura 14

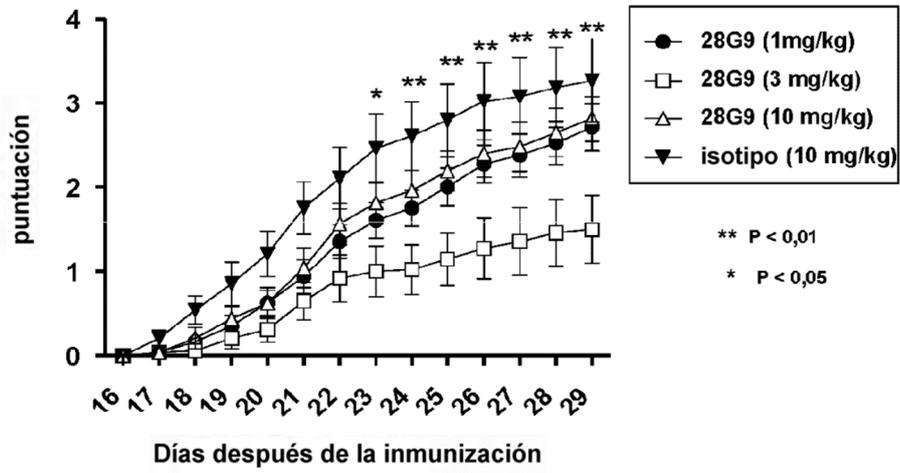


Figura 15