

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 123**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2010 PCT/US2010/055062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11056772**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2010 E 10828964 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2496707**

54 Título: **Anticuerpo anti TSLP genomodificado**

30 Prioridad:

**21.01.2010 US 297008 P**  
**04.11.2009 US 258051 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.09.2020**

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)**  
**126 East Lincoln Avenue**  
**Rahway, NJ 07065-0907 , US**

72 Inventor/es:

**PRESTA, LEONARD, G.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 784 123 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

Anticuerpo anti TSLP genomodificado

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/297.008; presentada el 21 de enero de 2010; y, de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/258.051; presentada el 4 de noviembre de 2009.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a un anticuerpo específico de linfopoyetina estromal tímica (TSLP, por las siglas del inglés *thymic stromal lymphopoietin*) y a sus usos, particularmente en trastornos inflamatorios e inflamatorios alérgicos.

15 **Antecedentes de la invención**

La TSLP es una citocina inmunitaria que induce respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediadas por células dendríticas con un fenotipo proalérgico de CD activadas por TSLP que desempeña un papel crucial en la inducción y el mantenimiento de respuestas inflamatorias alérgicas de linfocitos Th2 y mastocitos mediante la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas coestimuladoras proalérgicas que dirigen a los linfocitos T vírgenes a convertirse en linfocitos Th2, produciendo mediadores críticos de IL 4, IL 5 e IL 13 de la inflamación alérgica. La sobreexpresión de TSLP en la dermatitis atópica (DA), síndrome de Netherton y asma, indica un papel crucial de esta citocina en la patogénesis de estas enfermedades inflamatorias alérgicas. Esto se ha confirmado con modelos animales en los que la sobreexpresión transgénica de TSLP en la piel o el pulmón, así como la eliminación mediante el direccionamiento génico de reguladores negativos de TSLP, da como resultado enfermedades alérgicas inflamatorias que se parecen mucho a la dermatitis atópica humana o al asma. La presente divulgación proporciona anticuerpos anti TSLP genomodificados y sus usos para tratar trastornos inflamatorios, y particularmente, inflamatorios alérgicos, incluyendo asma y dermatitis atópica.

30 La presente invención impide posibles problemas de desamidación de anticuerpos de la técnica anterior, tales como los divulgados en la solicitud internacional (PCT) N° PCT/US2007/025531 (publicada como WO 2008/076321 A1). La desamidación de restos de Asn (N) es una degradación común de las proteínas, y puede afectar significativamente en la estructura y función de las proteínas. En los anticuerpos, El Asn (N) ubicado en las CDR puede experimentar desamidación rápidamente y puede dar lugar a cambios en las interacciones entre anticuerpo y antígeno y, por lo tanto, representa una grave preocupación durante el desarrollo de agentes terapéuticos basados en anticuerpos. Véase, por ejemplo, Vlaska et al., *Analytical Biochemistry* 392:145-154 (2009). Por tanto, es importante impedir estos posibles problemas de desamidación en los anticuerpos que están destinados a desarrollarse para su uso en seres humanos. Adicionalmente, es importante impedir estos problemas sin cambiar ninguna de las características importantes (tales como la afinidad de unión) del anticuerpo.

40 Chelius Dirk et al. "Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies", *Analytical Chemistry*, American Chemical Society, US, vol. 77, n° 18, 15 de septiembre de 2005 (15/09/2005), páginas 6004-6011 desvelan la identificación y caracterización de sitios de desaminación en las regiones CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> y C<sub>L</sub> conservadas de anticuerpos de gamma inmunoglobulina humana y el desarrollo de agentes terapéuticos biológicos resistentes a la desamidación.

El documento WO 2004/067568 desvela anticuerpos de IL-1 beta en los que se elimina la desamidación dentro de la región HCDR2 y cómo esto puede conducir a mejorar la estabilidad.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TSLP humana, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención también comprende una región constante de cadena pesada y/o una región constante de cadena ligera. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada humana  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3 o  $\gamma$ 4 o una variante de la misma. En otras realizaciones, la región constante de cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera humana lambda o kappa.

En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es policlonal, monoclonal, quimérico, de mono cinomolgo (cino), humanizado o completamente humano. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

La presente invención también contempla que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo sea fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub> y un diacuerpo. La presente invención también contempla que el compuesto de unión sea un nanocuerpo, un avímero o un aptímero.

5 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID: 12.

10 En otra realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se une a TSLP humana y de cino.

15 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede expresarse a partir del vector de expresión depositado en la ATCC (siglas del inglés *American Type Culture Collection*, colección americana de cultivos tipo) con el n.º de depósito PTA-10482.

20 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención comprende una cadena pesada y una cadena ligera que pueden expresarse a partir del vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que puede expresarse a partir del vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación comprende las regiones CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del anticuerpo expresado por el vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482.

25 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención comprende una cadena pesada que puede expresarse a partir del vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención comprende una región variable de cadena pesada que puede expresarse a partir del vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención comprende las regiones CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del anticuerpo expresado por el vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482.

30 La presente invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. La invención comprende un ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8. En una realización, la invención comprende un ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada codificada por el vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482. La divulgación también proporciona vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos de la invención unidos operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula hospedadora cuando la célula hospedadora se transfecta con el vector. En una realización, la invención proporciona el vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482. También se proporcionan células hospedadoras que comprenden estos vectores de expresión, y métodos para usar estos vectores de expresión para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención. En una realización, la célula hospedadora comprende el vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482. Los métodos para producir el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención, comprenden las siguientes etapas: cultivar la célula hospedadora en un medio de cultivo en condiciones en las que se exprese la secuencia de ácidos nucleicos, produciendo así el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que comprende las regiones variables de cadena ligera y pesada; y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención de la célula hospedadora o del medio de cultivo. En una realización, la invención comprende un método para producir un polipéptido que comprende las siguientes etapas: cultivar una célula hospedadora que comprende el vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482, en un medio de cultivo en condiciones en las que se exprese el vector, produciendo así polipéptidos que comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada; y recuperar los polipéptidos de la célula hospedadora o del medio de cultivo.

35 La presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención, que se une específicamente a TSLP humana, para su uso en un método para el tratamiento de trastornos inflamatorios a través de la supresión de una respuesta inmunitaria en un sujeto humano, que comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en una cantidad eficaz para bloquear la actividad biológica de TSLP. La presente invención también contempla la administración de un agente inmunosupresor o antiinflamatorio adicional. En una realización preferida, la respuesta inmunitaria es asma. En otra realización preferida, la respuesta inmunitaria es inflamación alérgica. En otra realización preferida, la inflamación alérgica es la rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica o dermatitis atópica. En otra realización preferida, la respuesta inmunitaria es fibrosis, enfermedad inflamatoria intestinal o linfoma de Hodgkin. En otra realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se administra en combinación con otro agente inmunomodulador.

65 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, puede estar en una composición

que comprenda el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional de la invención, la composición comprende además un agente inmunosupresor o antiinflamatorio.

- 5 En diversas realizaciones, la invención se refiere a medicamentos que comprenden el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. Por ejemplo, la invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a TSLP humana, para su uso en la preparación de un medicamento para suprimir una respuesta inmunitaria. La presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a TSLP humana, para su uso en la preparación de un medicamento para tratar el asma. La presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a TSLP humana, para su uso en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno inflamatorio. En una realización, el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio alérgico. En una realización, el trastorno inflamatorio alérgico es rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica o dermatitis atópica. En una realización preferida, el trastorno inflamatorio alérgico es dermatitis atópica. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede usarse para tratar seres humanos.

### Breve descripción de la figura

- 20 Figura 1. Alineamiento de la SEQ ID NO: 11 de la presente solicitud con la SEQ ID NO: 14 del documento WO2008/076321.

### Descripción detallada

- 25 Como se usa en la presente memoria, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las palabras en singular tales como "un", "uno/a" y "el/la", incluyen sus correspondientes referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

#### I. Definiciones

- 30 Las palabras "activación", "estimulación" y "tratamiento", aplicadas a células o a receptores, pueden tener el mismo significado, por ejemplo, activación, estimulación o tratamiento de una célula o de un receptor con un ligando, a menos que el contexto indique lo contrario o lo indique explícitamente. El término "ligando" incluye ligandos naturales y sintéticos, por ejemplo, citocinas, variantes de citocinas, análogos, muteínas y composiciones de unión derivadas de anticuerpos. el término "ligando" también incluye moléculas pequeñas, por ejemplo, peptidomiméticos de citocinas y péptidomiméticos de anticuerpos. "Activación" puede referirse a la activación celular regulada por mecanismos internos, así como por factores externos o ambientales. "Respuesta", por ejemplo, de una célula, tejido, órgano u organismo, incluye un cambio en el comportamiento bioquímico o fisiológico, por ejemplo, concentración, densidad, adhesión o migración dentro de un compartimento biológico, tasa de expresión génica o estado de diferenciación, donde el cambio se correlaciona con activación, estimulación o tratamiento, o con mecanismos internos tales como la programación genética.

- La "actividad" de una molécula puede describir o hacer referencia a la unión de la molécula con un ligando o con un receptor, a la actividad catalítica; a la capacidad de estimular la expresión génica o la señalización, diferenciación o maduración celular; a la actividad antigénica, a la modulación de actividades de otras moléculas, y similares. "Actividad" también puede significar actividad específica, por ejemplo, [actividad catalítica]/[mg de proteína] o [actividad inmunológica]/[mg de proteína], concentración en un compartimento biológico o similar.

- 50 "Administración" y "tratamiento" aplicados a un animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o líquido biológico, se refieren al contacto de un producto farmacéutico, terapéutico, agente de diagnóstico o composición, que es exógeno para el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o líquido biológico. "Administración" y "tratamiento" pueden referirse, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación y experimentales. El tratamiento de una célula incluye poner en contacto una célula con un reactivo, así como poner en contacto un reactivo con un líquido, donde el líquido está en contacto con la célula. "Administración" y "tratamiento" también quiere decir tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, con un reactivo, agente diagnóstico o compuesto de unión o con otra célula. "Tratamiento", aplicado a un sujeto humano, a un sujeto utilizado en medicina veterinaria, o a un sujeto utilizado en investigación, se refiere a tratamiento terapéutico, a medidas profilácticas o preventivas, a aplicaciones de investigación y diagnóstico.

- 60 "Compuesto de unión" se refiere a una molécula que comprende una o más secuencias de aminoácidos que se unen específicamente a TSLP humana. El compuesto de unión es un anticuerpo, Preferentemente un anticuerpo aislado, o el compuesto de unión, es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo.

- 65 "Composición de unión" se refiere a un compuesto de unión a TSLP en combinación con un estabilizante, excipiente, sal, tampón, disolvente o aditivo, capaz de unirse a una diana.

La presente invención también incluye complejos que comprenden cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, formando complejo con el polipéptido TSLP o un fragmento antigénico del mismo. Los complejos se pueden preparar poniendo en contacto el anticuerpo o fragmento con el polipéptido TSLP o fragmento antigénico.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que muestre la actividad biológica deseada. Por tanto, dicho término se usa en el sentido más amplio e incluye, específicamente, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad biológica deseada. "Anticuerpo aislado" se refiere al estado de purificación de un compuesto de unión y en dicho contexto significa que la molécula carece sustancialmente de otras moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono u otro material, como restos celulares y medios de crecimiento. Generalmente, el término "aislado" no pretende referirse a una ausencia completa de dicho material o a una ausencia de agua, tampones o sales, a menos que estén presentes en cantidades que interfieran sustancialmente con el uso experimental o terapéutico del compuesto de unión como se describe en la presente memoria.

Un "fragmento Fab" está compuesto por una cadena ligera y las regiones CH1 y variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios CH2 y CH3 de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen unidos por dos o más enlaces disulfuro y por interacciones hidrófobas de los dominios CH3.

Un "fragmento Fab" contiene una cadena ligera y una parte o fragmento de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio CH1 y también la región entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se pueda formar un enlace disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')<sub>2</sub>.

Un "fragmento F(ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una parte de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se forma un enlace disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento F(ab')<sub>2</sub> está compuesto por dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "fragmento de unión a TSLP" o "fragmento de unión del mismo" incluye un fragmento o un derivado de un anticuerpo (u otra sustancia de unión) que sigue conservando sustancialmente su actividad biológica de inhibir la actividad de TSLP. Por lo tanto, la expresión "fragmento de anticuerpo" o fragmento de unión a TSLP se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente a la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv); diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; por ejemplo, sc-Fv; anticuerpos de dominio; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Normalmente, un fragmento de unión o derivado conserva al menos el 10 % de su actividad inhibidora de TSLP. Preferentemente, un fragmento de unión o derivado conserva al menos el 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (o más) de su actividad inhibidora de TSLP, aunque será útil cualquier fragmento de unión con suficiente afinidad para ejercer el efecto biológico deseado. También se pretende que un fragmento de unión a TSLP pueda incluir sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteren sustancialmente su actividad biológica.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único epítipo antigénico. En cambio, las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, incluyen normalmente una multitud de anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) diferentes epítopos. El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., (1975) Nature 256: 495, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de fagotecas de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson et al., (1991) Nature 352: 624-628 y en Marks et al., (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los

que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos procedentes de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 81: 6851-6855).

Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solo la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones  $V_H$  se unen de manera covalente con un enlazador peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente. las dos regiones  $V_H$  de un anticuerpo de dominio bivalente pueden dirigirse al mismo antígeno o a antígenos diferentes.

Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión a antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades antigénicas. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo Fv monocatenario" o "scFv" se refiere a fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$  lo que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión con el antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315.

Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria también incluyen anticuerpos camelizados de dominio sencillo. Véase, por ejemplo, Muyldermans et al. (2001) Trends Biochem. Sci. 26:230; Reichmann et al. (1999) J. Immunol. Methods 231:25; los documentos WO 94/04678 y WO 94/25591 y la patente de Estados Unidos n.º 6,005,079. La presente divulgación proporciona anticuerpos de dominio sencillo que comprenden dos dominios  $V_H$  con modificaciones tales que se forman anticuerpos de dominio sencillo.

Como se usa en la presente memoria, el término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena polipeptídica ( $V_H$ - $V_L$  o  $V_L$ - $V_H$ ). Usando un enlazador que sea demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Por ejemplo, en los documentos EP 404.097, WO 93/11161 y en Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, se describen diacuerpos de manera muy detallada. Para una revisión de variantes de anticuerpos genomodificados, véase, en líneas generales, Holliger y Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como de anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen una secuencia mínima procedente de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente, dos, dominios variables, en los que todos, o sustancialmente todos, los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas, o sustancialmente todas, las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. El prefijo "h", "hu" o "hum" se añade a denominaciones de clones de anticuerpos cuando es necesario diferenciar anticuerpos humanizados (p. ej., "hu23B12") de anticuerpos parentales de roedores (p. ej., rata 23B12, o "r23B12"). Las formas humanizadas de anticuerpos de roedores generalmente comprenderán las mismas secuencias de CDR de los anticuerpos parentales de roedores, aunque para aumentar la afinidad o aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado pueden incluirse determinadas sustituciones de aminoácidos.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos con regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar funciones efectoras alteradas. Véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.624.821; y los documentos WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702; Presta (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656. Dicha modificación se puede usar para mejorar o suprimir diversas reacciones del sistema inmunitario, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, deleciones e inserciones), glucosilación o desglucosilación, y la adición de múltiples Fc. Los cambios en el Fc también pueden alterar la semivida de los anticuerpos en los anticuerpos terapéuticos, y una semivida más larga daría como resultado una dosificación menos frecuente, aumentando simultáneamente la comodidad y la disminución del uso de material. Véase Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116: 731 en 734-35.

La expresión "anticuerpo completamente humano", se refiere a un anticuerpo que comprende únicamente secuencias de proteína de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de hidratos de carbono murinos si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma

procedente de una célula de ratón. De forma similar, "anticuerpo de ratón" se refiere a un anticuerpo que comprende únicamente secuencias de inmunoglobulina de ratón.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "región hipervariable" se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende restos de aminoácidos de una región determinante de complementariedad o "CDR" (por las siglas del inglés *complementarity determining region*) (por ejemplo, restos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de cadena ligera y restos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). Como se usa en la presente memoria, la expresión restos "estructurales" o "FR" (del inglés *framework*) se refiere a aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de la región hipervariable definidos en la presente memoria como restos CDR. La numeración de restos anterior se relaciona con el sistema de numeración de Kabat y no se corresponde necesariamente en detalle con la numeración de secuencias en el Listado de secuencias adjunto.

"Unión" se refiere a una asociación de la composición de unión con una diana en donde la asociación da como resultado una reducción en el movimiento Browniano normal de la composición de unión, en casos en donde la composición de unión puede disolverse o suspenderse en solución.

25 Las "variantes conservativamente modificadas" o "sustitución conservativa" se refieren a sustituciones de aminoácidos conocidas por los expertos en esta materia y que generalmente pueden realizarse sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta materia reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson, et al., *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224 (4ª edición, 1987)). Dichas sustituciones a modo de ejemplo se realizan, preferentemente, de acuerdo con las expuestas en la Tabla 1 indicada a continuación:

30

Tabla 1

Ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos	
Resto original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp(D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Resto original	Sustitución conservativa
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

35 La expresión "cantidad eficaz" incluye una cantidad suficiente para mejorar o prevenir un síntoma o indicio de la afección médica. Cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar un diagnóstico. Una cantidad eficaz para un paciente particular o para un sujeto utilizado en medicina veterinaria, puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se vaya a tratar, la salud general del paciente, el método, vía y dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.888.530 concedida a Netti et al.). Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o el protocolo de dosificación que impide que se produzcan efectos secundarios o efectos tóxicos significativos. El efecto dará como resultado un aumento de una medida o de un parámetro de diagnóstico de al menos 5 %, generalmente de al menos 10 %, más generalmente de al menos 20 %, mucho más generalmente de al menos 30 %, preferentemente de al menos 40 %, más preferentemente de al menos 50 %, más preferiblemente de al menos 60 %, idealmente de al menos 70 %, más idealmente de al menos 80 % y mucho más idealmente de al menos 90 %, en donde 100 % se define como el

parámetro de diagnóstico mostrado por un sujeto normal (véase, por ejemplo, Maynard, et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Ratón, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, UK).

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que habitualmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente en cuanto a la forma o configuración de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se diferencian de las moléculas de ácido nucleico tal como existen en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que habitualmente expresan el anticuerpo en donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

15 La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente a un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

20 Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se ubica en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretor está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, son contiguas y están en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se realiza mediante ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

30 Como se usa en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular", se usan indistintamente y todas estas denominaciones incluyen la descendencia. Por tanto, la palabra "transformantes" y la frase "células transformadas", incluyen la célula primaria sujeto y los cultivos procedentes de ella, sin tener en cuenta el número de transferencias. Se entiende también que puede que toda la descendencia no sea exactamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones intencionadas o involuntarias. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la detectada en la célula originalmente transformada. Cuando se propongan distintas denominaciones, éstas serán obvias en función del contexto.

40 Como se usa en la presente memoria, "reacción en cadena de polimerasa" o "PCR" (por las siglas del inglés *polymerase chain reaction*), se refiere a un procedimiento o a una técnica en la que se amplifican pequeñas cantidades de una porción específica de ácido nucleico, ARN y/o ADN, como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 4.683.195. Generalmente, se requiere disponer de información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá, de tal forma que puedan diseñarse cebadores oligonucleotídicos; estos cebadores tendrán una secuencia idéntica o similar a la de las cadenas opuestas del molde que se vaya a amplificar. Los nucleótidos del extremo 5' de los dos cebadores, pueden coincidir con los de los extremos del material amplificado. La PCR puede usarse para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas a partir de ADN genómico total y de ADNc transcrito a partir de secuencias de ARN celular total, bacteriófagos o plásmidos, etc. Véase, en líneas generales, Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.) Como se usa en la presente memoria, se considera que la PCR es un ejemplo, aunque no el único, de un método de reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de ensayo de ácido nucleico que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como cebador y una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar una porción específica de ácido nucleico.

55 Como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencia de línea germinal" se refiere a una secuencia de secuencias de ADN de inmunoglobulina no reorganizadas. Se puede usar cualquier fuente adecuada de secuencias de ADN de inmunoglobulina no reorganizadas.

60 Los "inhibidores" son compuestos que disminuyen, bloquean, previenen, retrasar la activación, inactivan, insensibilizan o regulan negativamente, por ejemplo, un gen, una proteína, un ligando, un receptor o una célula. Un inhibidor también se puede definir como una composición que reduce, bloquea o inactiva una actividad constitutiva. Un "antagonista" es un compuesto que se opone a las acciones de un agonista. Un antagonista previene, reduce, inhibe o neutraliza la actividad de un agonista. Un antagonista también puede prevenir, inhibir o reducir la actividad constitutiva de una diana, por ejemplo, un receptor diana, incluso cuando no se haya identificado un agonista.

65 Para examinar el alcance de la inhibición, por ejemplo, muestras o ensayos que comprenden, por ejemplo, una proteína, un gen, una célula o un organismo determinado, se tratan con un posible agente activador o inhibidor y se

- comparan con muestras de control que no contengan el agente. A las muestras de control, es decir, no tratadas con agente, se las asigna un valor de actividad relativa de 100 %. La inhibición se logra cuando el valor de actividad en relación con el del control, es de aproximadamente 90 % o menor, normalmente de 85 % o menor, más normalmente de 80 % o menor, mucho más normalmente de 75 % o menor, generalmente de 70 % o menor, más generalmente de 65 % o menor, mucho más generalmente de 60 % o menor, normalmente de 55 % o menor, normalmente de 50 % o menor, más normalmente de 45 % o menor, mucho más normalmente de 40 % o menor, preferentemente de 35 % o menor, más preferentemente de 30 % o menor, aún más preferentemente de 25 % o menor, y mucho más preferentemente menor de 25 %.
- Los criterios de valoración pueden controlarse de la siguiente manera. La inhibición y respuesta al tratamiento, por ejemplo, de una célula, líquido fisiológico, tejido, órgano y sujeto animal o humano, pueden controlarse mediante un criterio de valoración. El criterio de valoración puede comprender una cantidad o porcentaje predeterminado de, por ejemplo, un indicio de inflamación, oncogenicidad, o desgranulación o secreción celular, tal como la liberación de una citocina, oxígeno tóxico o una proteasa. El criterio de valoración puede comprender, por ejemplo, una cantidad predeterminada de flujo o transporte iónico; migración celular; adhesión celular; proliferación celular; potencial de metástasis; diferenciación celular; y cambio en el fenotipo, por ejemplo, cambio en la expresión del gen relacionado con la inflamación, apoptosis, transformación, ciclo celular o metástasis (véase, por ejemplo, Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:145-158; Hood y Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:91-100; Timme, et al. (2003) *Curr. Drug Targets* 4:251-261; Robbins y Itzkowitz (2002) *Med. Clin. North Am.* 86:1467-1495; Grady y Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:101-128; Bauer, et al. (2001) *Glia* 36:235-243; Stanimirovic y Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10:113-126).
- Un criterio de valoración de inhibición es generalmente el 75 % del control o menor, preferentemente el 50 % del control o menor, más preferentemente el 25 % del control o menor, y lo más preferentemente el 10 % del control o menor. Generalmente, un criterio de valoración de activación es al menos el 150 % del control, preferentemente al menos dos veces el control, más preferentemente al menos cuatro veces el control, y lo más preferentemente al menos 10 veces el control.
- La expresión se une "específicamente" o "selectivamente", cuando se refiere a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno o a otro par de unión, indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína, por ejemplo, TSLP, en una población heterogénea de proteínas y/u otros agentes biológicos. Por tanto, en condiciones señaladas, un ligando/antígeno específico se une a un receptor/anticuerpo particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra.
- El anticuerpo, o la composición de unión procedente del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, del método contemplado, se une a su antígeno con una afinidad que es al menos diez veces mayor, más preferentemente al menos 20 veces mayor, y lo más preferentemente al menos 50 veces mayor, que la afinidad con antígenos no relacionados. En una realización preferida, el anticuerpo tendrá una afinidad mayor que aproximadamente  $10^9$  litros/mol, determinada, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard (Munsen, et al. (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239).
- Como se usa en la presente memoria, la expresión "trastorno inflamatorio" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por inflamación local en un sitio de lesión o infección e incluye, sin limitación, inflamación alérgica, enfermedades autoinmunitarias y otros trastornos caracterizados por la acumulación indeseada de células inmunitarias en un sitio de tejido local.
- Como se usa en la presente memoria, la expresión "agente inmunomodulador" se refiere a agentes naturales o sintéticos que suprimen o modulan una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta humoral o celular. Los agentes inmunomoduladores incluyen agentes inmunosupresores o antiinflamatorios.
- Los "agentes inmunosupresores", "fármacos inmunosupresores" o "inmunosupresores", como se usan en la presente memoria, son agentes terapéuticos que se usan en terapia inmunosupresora para inhibir o prevenir la actividad del sistema inmunitario. Clínicamente se usan para prevenir el rechazo de órganos y tejidos trasplantados (por ejemplo, médula ósea, corazón, riñón, hígado), y/o en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o enfermedades cuyo origen es más probablemente autoinmunitario (por ejemplo, artritis reumatoide, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple). Los fármacos inmunosupresores se pueden clasificar en cuatro grupos: glucocorticoides, citostáticos, anticuerpos (incluidos los modificadores de la respuesta biológica o los DMARD (por las siglas del inglés *Disease Modifying Antirheumatic Drugs* fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad); fármacos que actúan sobre inmunofilinas; otros fármacos, incluyendo agentes quimioterapéuticos conocidos usados en el tratamiento de trastornos proliferativos. Para la esclerosis múltiple, en particular, los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse junto con una nueva clase de agentes terapéuticos similares a proteínas de unión a mielina, conocidos como copaxones.
- Los "agentes antiinflamatorios" o "fármacos antiinflamatorios", se usan para representar agentes terapéuticos tanto esteroideos como no esteroideos. Los esteroides, también conocidos como corticosteroides, son fármacos muy parecidos al cortisol, una hormona producida de manera natural por las glándulas suprarrenales. Los esteroides se

usan como tratamiento principal en determinadas afecciones inflamatorias, tales como: vasculitis sistémica (inflamación de vasos sanguíneos); y miositis (inflamación del músculo). Los esteroides también pueden usarse selectivamente para tratar afecciones inflamatorias tales como: artritis reumatoide (artritis inflamatoria crónica que se produce en las articulaciones a ambos lados del cuerpo); lupus eritematoso sistémico (una enfermedad generalizada causada por una función anómala del sistema inmunitario); síndrome de Sjögren (trastorno crónico que produce xeroftalmía y xerostomía).

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, generalmente abreviados como AINE, son fármacos con efecto analgésico, antipirético y antiinflamatorio que reducen el dolor, la fiebre y la inflamación. La expresión "no esteroideo" se usa para diferenciar estos fármacos de los esteroides, que (entre una amplia gama de otros efectos) tienen una acción antiinflamatoria, similar a la depresora de eicosanoides. Los AINE generalmente están indicados para el alivio sintomático de las siguientes afecciones: artritis reumatoide; artrosis; artropatías inflamatorias (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter); gota aguda; dismenorrea; dolor óseo metastásico; cefalea y migraña; dolor postoperatorio; dolor leve a moderado debido a inflamación y lesión tisular; pirexia; y cólico renal. Los AINE incluyen salicilatos, ácidos arilalcanoicos, ácidos 2-arilpropiónicos (profenos), ácidos N-arilntranílicos (ácidos fenámicos), oxicams, coxibs (inhibidores selectivos de COX-2), sulfonanilidas, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, salsalato, sulindaco o tolmetina.

## II. General

La presente invención proporciona anticuerpos anti TSLP genomodificados y sus usos para tratar trastornos inflamatorios, y particularmente, inflamatorios alérgicos. En una realización preferida, el trastorno inflamatorio es asma. En una realización preferida, el trastorno inflamatorio alérgico es rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica o dermatitis atópica. La presente invención también proporciona anticuerpos anti TSLP genomodificados para tratar la fibrosis, enfermedad inflamatoria intestinal o linfoma de Hodgkin.

Como se usa en la presente memoria, el término "TSLP" incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos de TSLP. La secuencia de aminoácidos de TSLP humana se expone en la SEQ ID NO: 4 de la publicación internacional N.º WO00/17362.

## III. Anticuerpos de la invención genomodificados específicos de TSLP

La invención se refiere a anticuerpos anti TSLP genomodificados que comprenden regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera específicas.

Para genomodificar anticuerpos de manera recombinante se han descrito métodos, por ejemplo, Boss et al. (patente de Estados Unidos N.º 4.816.397), Cabilly et al. (patente de Estados Unidos N.º 4,816,567), Law et al. (publicación de solicitud de patente europea N.º 438 310) y Winter (publicación de solicitud de patente europea N.º 239400).

Los anticuerpos genomodificados de la invención incluyen aquellos en los que en las regiones VH y/o VL se han hecho modificaciones en restos estructurales, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, dichas modificaciones estructurales se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "retromutar" uno o más restos estructurales en la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a una mutación somática puede contener restos estructurales que son diferentes a los de la secuencia de la línea germinal de la que proviene el anticuerpo. Dichos restos se pueden identificar comparando las secuencias estructurales del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que proviene el anticuerpo.

Otro tipo de modificación estructural implica mutar uno o más restos en la región estructural o incluso en una o más regiones CDR, para eliminar epítomos de linfocitos T y reducir de este modo la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Esta estrategia también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 20030153043.

Además, o como alternativa a las modificaciones hechas en la región estructural o en las regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden genomodificarse para que incluyan modificaciones en la región Fc, normalmente, para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más grupos químicos pueden fijarse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice de Kabat de la UE.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG4 que comprende una mutación de serina a prolina en una posición correspondiente a la posición 228 (S228P; Índice de la UE) en la región bisagra de la región constante de la cadena pesada. Se ha informado que esta mutación suprime la heterogeneidad de los puentes

disulfuro entre cadenas pesadas en la región bisagra (Angal et al. citado anteriormente; la posición 241 se basa en el sistema de numeración de Kabat.

5 En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que el número de restos de cisteína en la región bisagra, se altera, por ejemplo, se aumenta o se disminuye. Esta estrategia se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos N.º 5.677.425. El número de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

10 En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, en la región de interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento Fc de la bisagra, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos, de manera que el anticuerpo tiene una unión a la proteína A estafilocócica (SpA) deteriorada en relación con una unión a la SpA del dominio del fragmento Fc de la bisagra. Esta estrategia se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos N.º 6.165.745.

15 En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 6.277.375. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, en la región CH1 o CL al anticuerpo puede alterarse para que contenga un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 5.869.046 y 6.121.022.

25 En otras realizaciones más, la región Fc se altera sustituyendo al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar una o más funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse por un resto de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc del componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos N.º 5.624.821 y 5.648.260.

30 En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden reemplazarse por un resto de aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una unión a C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Esta estrategia se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos N.º 6.194.551.

35 En otro ejemplo, en las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran uno o más restos de aminoácidos para así alterar la capacidad del anticuerpo de fijarse al complemento. Esta estrategia se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351.

40 En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Esta estrategia se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072. Además, se han mapeado los sitios de unión en la IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Se demostró que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoraban la unión a FcγRIII. Adicionalmente, se demostró que los siguientes mutantes de combinación mejoraban la unión de FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A and S298A/E333A/K334A.

55 En otra realización más, la glucosilación de un anticuerpo se modifica o altera, para delectonar o añadir grupos de hidratos de carbono a los anticuerpos. Por ejemplo, se puede generar un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones de hidratos de carbono pueden realizarse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden generar uno o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación estructurales para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.714.350 y 6.350.861.

65 Además, o como alternativa, se puede generar un anticuerpo que tenga un tipo de glucosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras de bisección de GlcNAc aumentadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glucosilación alterada aumentan la capacidad de CCDA de los anticuerpos. Dichas modificaciones de hidratos de carbono se pueden realizar, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada.

En la materia se han descrito células con maquinaria de glucosilación alterada y pueden usarse como células hospedadoras en las que expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 ( $\alpha(1,6)$ -fucosiltransferasa), de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus hidratos de carbono. Las líneas celulares ms704, Ms705 y Ms709 FUT8-/- se crearon a través de la interrupción dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (véase la publicación de patente de Estados Unidos N.º 20040110704 y Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87: 614-22). Como otro ejemplo, en el documento EP 1.176.195 se describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular muestran hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace  $\alpha$ -1,6. En el documento EP 1.176.195 también describen líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o que no tienen la actividad enzimática, por ejemplo, la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación de PCT WO 03/035835 describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para fijar fucosa a hidratos de carbono unidos a Asn(297), dando también como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). También pueden producirse anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado en huevos de gallina, como se describe en la publicación PCT WO 06/089231. Como alternativa, pueden producirse anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado en células vegetales, tales como las del género *Lemna*. En la publicación PCT WO 99/54342 se describen líneas celulares genomodificadas para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteína (por ejemplo,  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares genomodificadas muestran estructuras de bisección de GlcNac aumentadas que dan como resultado mayor actividad de CCDA de los anticuerpos (véase también Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Como alternativa, los restos de fucosa del anticuerpo pueden escindirse usando una enzima fucosidasa; por ejemplo, la fucosidasa  $\alpha$ -L-fucosidasa elimina restos de fucosilo de los anticuerpos (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos de la presente memoria, que se contempla en esta divulgación, es la pegilación. Se puede pegilar un anticuerpo para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, normalmente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos de PEG comienzan a fijarse al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Como se usa en la presente memoria, el término "polietilenglicol" pretende incluir cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono alcoxí (C1-C10) o ariloxi polietilenglicol o polietilenglicol maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo a pegilar es un anticuerpo aglucosilado. En la técnica se conocen métodos para pegilar proteínas y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 154 316 y EP 0 401 384.

pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti TSLP humanizado de la invención introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo anti TSLP humanizado, o mediante síntesis de péptidos. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, restos dentro de las secuencias de aminoácidos mostradas para los anticuerpos anti TSLP humanizados desvelados y reivindicados en la presente memoria. Puede efectuarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Como se ha mencionado anteriormente, los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo anti TSLP humanizado, tales como cambiar el número o la posición de sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del polipéptido de anticuerpo anti TSLP humanizado, que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis, se denomina "mutagénesis por barrido de alanina", según describen Cunningham y Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085. En esta ocasión, se identificaron un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga, tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se sustituyeron por un aminoácido neutro o con carga negativa (más preferentemente alanina o polialanina) que influye sobre la interacción de los aminoácidos con el antígeno TSLP. después, los restos de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional por las sustituciones se perfeccionan introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque se predetermine el sitio para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos, la naturaleza de la mutación de por sí no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se llevó a cabo un barrido de Ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se exploró la actividad deseada de las variantes de anticuerpo anti TSLP humana expresadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales que varían en longitud desde un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos sencillos o múltiples. Como ejemplos de inserciones terminales se incluyen un anticuerpo anti TSLP humanizado con un resto de metionilo N terminal o el anticuerpo fusionado a una etiqueta epitópica. Otras

variantes de inserción de la molécula de anticuerpo anti TSLP humanizado incluyen la fusión en el extremo N o C del anticuerpo anti TSLP humanizado de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

- 5 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto de aminoácido en la molécula de anticuerpo anti TSLP humanizado eliminado y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen los bucles hipervariables, aunque también se contemplan alteraciones estructurales (FR). Los restos de la región hipervariable o los restos FR implicados en la unión al antígeno generalmente se sustituyen de una manera relativamente conservativa.
- 10 Otro tipo más de variante de aminoácido es la sustitución de restos para proporcionar una mayor estabilidad química del anticuerpo humanizado final.

En determinadas realizaciones, será conveniente cambiar determinados aminoácidos, que contienen cadenas laterales expuestas, por otro resto de aminoácido, para proporcionar una mayor estabilidad química del anticuerpo final, del siguiente modo. Como se describe en la presente memoria, un resto de asparagina (Asn) puede cambiarse por uno de Gln o Ala para reducir la posible formación de isoaspartato en cualquier secuencia de Asn-Gly dentro de una CDR. Un problema similar puede ocurrir en una secuencia Asp-Gly. Reissner y Aswad (2003) Cell. Mol. Life Sci. 60: 1281. La formación de isoaspartato puede debilitar o anular completamente la unión de un anticuerpo con su antígeno diana. Véase, Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 a 734. La asparagina se puede cambiar por glutamina (Gln). También puede ser conveniente alterar un aminoácido adyacente a un resto de asparagina (Asn) o glutamina (Gln) para reducir la probabilidad de desamidación que se produce a mayor velocidad cuando se producen pequeños aminoácidos adyacentes a la asparagina o la glutamina. Véase, Bischoff y Kolbe (1994) J. Chromatog. 662:261. Además, como se describe en la presente memoria, en las CDR, cualquier resto de metionina (normalmente Met expuesta a disolvente), puede cambiarse por Lys, Leu, Ala o Phe para reducir la posibilidad de que el azufre de la metionina se oxide, lo que reduciría la afinidad de unión al antígeno y también contribuiría a la heterogeneidad molecular en la preparación del anticuerpo final. *Id.* La metionina puede cambiarse por alanina (Ala). Adicionalmente, como se describe en la presente memoria, para prevenir o minimizar posibles enlaces peptídicos de Asn-Pro escindibles, puede ser conveniente alterar cualquier combinación Asn-Pro encontrada en una CDR por Gln-Pro, Ala-Pro o Asn-Ala. Posteriormente se exploran anticuerpos con dichas sustituciones para garantizar que las sustituciones no disminuyan la afinidad de unión a TSLP u otra actividad biológica deseada, a niveles inaceptables.

TABLA 2

Ejemplos de variantes de CDR estabilizadoras	
Resto de CDR	Secuencia de variante estabilizadora
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly o Asn-Ala (Q-G), (AG) o (NA)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly o Asp-Ala (E-G), (AG) o (DA)
Met (normalmente expuesta a disolvente) (M)	Lys, Leu, Ala o Phe (K), (L), (A) o (F)
Asn (N)	Gln o Ala (Q) o (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro o Asn-Ala (Q-P), (A-P) o (N-A)

35 Además, como se describe en la presente memoria, los restos de metionina en las CDR de roedores pueden cambiarse para reducir la posibilidad que el azufre de la metionina se oxide, lo que reduciría la afinidad de unión al antígeno y también contribuiría a la heterogeneidad molecular en la preparación del anticuerpo final. *Id.* La metionina puede cambiarse por alanina (A). Posteriormente se exploran anticuerpos con dichas sustituciones para garantizar que las sustituciones no disminuyan la afinidad de unión a TSLP a niveles inaceptables.

40 Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo específico de TSLP humanizado, se preparan mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida), mutagénesis con PCR y mutagénesis con casete de una variante preparada inicialmente o de una versión no variante del anticuerpo anti TSLP humanizado.

Habitualmente, las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti TSLP humanizado tendrán una

secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 97 % con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado original de la cadena pesada o ligera, más preferentemente de al menos 98 %, más preferentemente al menos 99 %. En la presente memoria, la identidad u homología con respecto a esta secuencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos del anticuerpo anti TSLP humanizado, después de alinear las secuencias y, si fuera necesario, introducir huecos, para obtener el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin tener en cuenta ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, supresiones o inserciones N-terminal, C-terminal o interna en la secuencia de anticuerpo se interpretará como que afecta a la identidad u homología de la secuencia.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. Se puede usar cualquier isotipo de IgG, incluyendo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>. También se contemplan variantes de los isotipos de IgG. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo. La optimización de las secuencias de dominio constante necesarias para generar la actividad biológica deseada se logra fácilmente explorando los anticuerpos en los ensayos biológicos que se describen a continuación.

Asimismo, en las composiciones y métodos de la presente memoria, puede usarse cualquier clase de cadena ligera. Específicamente, kappa, lambda, o sus variantes, son útiles en las presentes composiciones y métodos.

Como se describe en la presente memoria, se puede usar cualquier parte adecuada de las secuencias de CDR del anticuerpo no humano. Las secuencias de CDR pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o delección de al menos un resto de modo que la secuencia de CDR sea distinta de la secuencia de anticuerpo humano y no humano empleada. Se contempla que dichas mutaciones sean mínimas. Normalmente, al menos el 95 % de los restos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de los restos de CDR no humanos, y más preferentemente más del 97 %.

Como se describe en la presente memoria, se puede usar cualquier parte adecuada de las secuencias FR del anticuerpo humano. Las secuencias FR pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o delección de al menos un resto de modo que la secuencia FR sea distinta de la secuencia de anticuerpo humano y no humano empleada. Se contempla que dichas mutaciones sean mínimas. Normalmente, al menos el 75 % de los restos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de los restos FR humanos, más frecuentemente el 90 %, y más preferentemente más del 95 %.

Los restos de CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición de secuencia estándar de Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1987).

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención comprende, una o más de las siguientes secuencias:

- La secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable mostrada en la SEQ ID NO: 7.
- La secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable mostrada en la SEQ ID NO: 8.
- La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena pesada variable mostrada en la SEQ ID NO: 9.
- La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena ligera variable mostrada en la SEQ ID NO: 10.
- La secuencia de aminoácidos de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 11. Esta secuencia puede comprender además la siguiente secuencia líder: MAVLGLLFCLVTFPSCVLS (SEQ ID NO:15).
- La secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 12. Esta secuencia puede comprender además la siguiente secuencia líder: MAPVQLLGLLVFLPAMRC (SEQ ID NO:16).
- La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 13. Esta secuencia puede comprender además una secuencia que codifica una secuencia líder, preferentemente la siguiente secuencia líder: MAVLGLLFCLVTFPSCVLS (SEQ ID NO:15).
- La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 14. Esta secuencia puede comprender además una secuencia que codifica una secuencia líder, preferentemente la siguiente secuencia líder: MAPVQLLGLLVFLPAMRC (SEQ ID NO:16).

La presente invención incluye un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8 o 12 y una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 y 11 (por ejemplo, SEQ ID NO: 7 emparejada con SEQ ID NO: 8; o SEQ ID NO: 11 emparejada con SEQ ID NO: 12). En una realización de la invención, dicho anticuerpo o fragmento puede estar unido a un dominio constante de inmunoglobulina, tal como IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>). También forma parte de la invención, una composición farmacéutica de la misma, que comprende dicho anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, en las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> humanizadas proporcionadas en la presente memoria se pueden añadir diferentes dominios constantes. Por ejemplo, si un uso particular previsto de un anticuerpo (o fragmento) de la

presente invención fuera a requerir funciones efectoras alteradas, se puede usar un dominio constante de cadena pesada que no sea de IgG1. Aunque los anticuerpos de IgG1 proporcionan una semivida prolongada y funciones efectoras, tales como la activación del complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, puede que dichas actividades no sean convenientes para todos los usos del anticuerpo. En dichos casos, puede usarse, por ejemplo, un dominio constante de IgG4.

#### IV. Conjugados de anticuerpos

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención también puede conjugarse con un grupo químico. El grupo químico puede ser, entre otros, un polímero, un radionúclido o un factor citotóxico. Preferentemente, el grupo químico es un polímero que aumenta la semivida de la molécula de anticuerpo en el cuerpo de un sujeto. Los polímeros adecuados incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG) (p. ej., PEG con un peso molecular de 2 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa, 20 kDa, 30 kDa o 40 kDa), dextrano y monometoxipolietilenglicol (mPEG). Lee, et al., (1999) (Bioconj. Chem. 10: 973-981) desvelan anticuerpos monocatenarios conjugados con PEG. Wen, et al., (2001) (Bioconj. Chem. 12: 545-553) desvelan anticuerpos conjugados con PEG que están fijados a un quelante radiometálico (ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA)).

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención también puede conjugarse con marcadores tales como  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{57}\text{A}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{59}\text{Fe}$ ,  $^{57}\text{Se}$ ,  $^{152}\text{Eu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{217}\text{Ci}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{234}\text{Th}$  y  $^{40}\text{K}$ ,  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{52}\text{Tr}$  y  $^{56}\text{Fe}$ .

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención también puede conjugarse con marcadores fluorescentes o quimioluminiscentes, incluidos fluoróforos tales como quelatos de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiocianato, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaladehído, fluorescamina,  $^{152}\text{Eu}$ , dansilo, umbelliferona, luciferina, marcador luminal, marcador isoluminal, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un marcador de sales de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de aecurina, 2,3-dihidroftalazinodionas, biotina/avidina, marcadores giratorios y radicales libres estables.

Las moléculas de anticuerpo también pueden conjugarse con un factor citotóxico tal como una toxina diftérica, la cadena A de exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii* y compuestos (p. ej., ácidos grasos), proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* PAPI, PAPII y PAP-S, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina.

Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar las moléculas de anticuerpo de la invención con los diversos grupos, incluidos los métodos descritos por Hunter, et al., (1962) Nature 144: 945; David et al., (1974) Biochemistry 13: 1014; Pain, et al., (1981) J. Immunol. Meth. 40:219; y Nygren, J., (1982) Histochem. and Cytochem. 30:407. Los métodos para conjugar anticuerpos son convencionales y muy bien conocidos en la técnica.

En otras realizaciones más, a las regiones  $V_L$  y  $V_H$  humanizadas proporcionadas en la presente memoria se pueden añadir diferentes dominios constantes. Por ejemplo, si un uso particular previsto de un anticuerpo (o fragmento) de la presente invención fuera a requerir funciones efectoras alteradas, se puede usar un dominio constante de cadena pesada distinto de IgG1, o se puede utilizar un híbrido de IgG1/IgG4.

Aunque los anticuerpos de IgG1 proporcionan una semivida prolongada y funciones efectoras, tales como la activación del complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, puede que dichas actividades no sean convenientes para todos los usos del anticuerpo. En dichos casos, puede usarse, por ejemplo, un dominio constante de IgG4. En el anticuerpo monoclonal humano 8D5 (hu Mab8D5), el dominio constante de la IgG4 difiere del dominio constante de la IgG4 humana nativa (registro Swiss-Prot N.º P01861.1) en la posición 108, en donde el aminoácido Ser108 nativo se reemplaza con Pro, para prevenir un posible enlace disulfuro intercadena entre Cys106 y Cys109 que podría interferir con la correcta formación de enlaces disulfuro intracadena. Véase Angal et al. (1993) Mol. Immunol. 30:105.

V. Actividad biológica de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen las características convenientes identificadas en la presente memoria en un anticuerpo anti TSLP humanizado, pueden explorarse para determinar la actividad biológica inhibidora *in vitro* o la afinidad de unión adecuada.

Las afinidades de los anticuerpos (por ejemplo, por la TSLP humana) puede determinarse utilizando análisis estándar. Los anticuerpos humanizados preferidos son aquellos que se unen a la TSLP humana con un valor  $K_D$  no mayor de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M; preferentemente no mayor de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M; más preferentemente no mayor de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M; y lo más preferentemente no mayor de aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  M.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos útiles en las presentes composiciones y métodos, son anticuerpos y fragmentos biológicamente activos. Como se usa en la presente memoria, la expresión "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse al epítipo antigénico deseado y ejercer directa o indirectamente un efecto biológico. Normalmente, estos efectos son resultado de la ineficacia de la TSLP para unirse con su receptor. En una realización, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos útiles en las presentes composiciones y métodos inhiben la proliferación inducida por hTSLP de una línea celular Baf-3 transfectada con el receptor de hTSLP y con IL-7 $\alpha$ ; la expresión de la luciferasa inducida por hTSLP de una línea celular Baf-3 transfectada con el receptor de TSLP y un sistema indicador de luciferasa; la secreción de TARC (quimiocina reguladora de la actividad del timo), inducida por TSLP, de monocitos primarios humanos aislados de CMSP (células mononucleares de sangre periférica); y la inducción de la diferenciación de Th2.

Como se usa en la presente memoria, el término "específico" se refiere a la unión selectiva del anticuerpo con el epítipo del antígeno diana. Los anticuerpos pueden analizarse para determinar la especificidad de unión comparando la unión a TSLP con la unión a un antígeno irrelevante o a una mezcla de antígenos en un conjunto de condiciones determinado. Si el anticuerpo se une a TSLP al menos 10, y preferentemente 20 o 50 veces más, que a un antígeno irrelevante o a una mezcla de antígenos, entonces se considera que es específico. Un anticuerpo que "se une específicamente" a TSLP, no se une a proteínas que no comprenden las secuencias procedentes de TSLP, es decir, "especificidad", como se usa en la presente memoria, se refiere a especificidad de TSLP, y no a la de cualquier otra secuencia que pueda estar presente en la proteína en cuestión. Por ejemplo, como se usa en la presente memoria, un anticuerpo que "se une específicamente" a TSLP, se unirá normalmente a TSLP FLAG-h, que es una proteína de fusión que comprende TSLP y una etiqueta peptídica FLAG $\text{®}$ , pero no se unirá a la etiqueta peptídica FLAG $\text{®}$  sola o cuando esté fusionada con una proteína distinta de TSLP.

## VI. Composiciones farmacéuticas

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences y US Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden prepararse mezclando con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, pastas, soluciones o suspensiones acuosas (véase, por ejemplo, Hardman, et al. (2001) Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpos, administradas solas o en combinación con un agente inmunosupresor, pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o con animales de laboratorio, por ejemplo, para determinar la DL<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción entre DL<sub>50</sub>/DE<sub>50</sub>. Se prefieren los anticuerpos que presentan índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y de estudios en animales, pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro del intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada.

Las vías de administración adecuadas incluyen la administración parenteral, tal como la administración intramuscular, intravenosa o subcutánea. La administración del anticuerpo usado en la composición farmacéutica o para poner en práctica el método de la presente invención puede llevarse a cabo de diversas maneras convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o cutánea, inyección subcutánea, intraperitoneal, parenteral, intraarterial o intravenosa. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se administra por vía intravenosa. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se administra por vía subcutánea.

Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección del anticuerpo directamente en una articulación artrítica o una lesión inducida por un patógeno caracterizada por inmunopatología, a menudo en una formulación en depósito o de liberación sostenida. Además, el anticuerpo puede administrarse en un sistema de suministro de fármacos dirigido, por ejemplo, en un liposoma revestido con un anticuerpo específico de tejido, dirigido, por ejemplo, a la articulación artrítica o lesión inducida por patógenos caracterizada por inmunopatología. Los liposomas se dirigirán al tejido afectado y serán captados por éste de manera selectiva.

La selección de un régimen de administración de un agente terapéutico depende de diversos factores, incluyendo la

velocidad de recambio sérico o tisular de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. Preferentemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente de acuerdo con un nivel aceptable de efectos secundarios. Por consiguiente, la cantidad de suministro biológico depende en parte de la entidad particular y de la gravedad de la afección que se vaya a tratar. Se dispone de orientación en cuanto a la selección de dosis apropiadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom, et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon, et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz, et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky, et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

La determinación de la dosis adecuada la realiza el médico, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos en la técnica o que sospecha o espera que influyan en el tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y después se aumenta poco a poco hasta obtener el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Como medidas diagnósticas importantes se incluyen, por ejemplo, los síntomas de inflamación o nivel de citocinas inflamatorias producidas. Preferentemente, el producto biológico que se utilizará procede de la misma especie que la del animal al que se dirige el tratamiento, minimizando así la respuesta inflamatoria, autoinmunitaria o proliferativa frente al reactivo.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y citocinas, pueden proporcionarse por infusión continua o por dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana o 1-7 veces por semana. Las dosis pueden administrarse por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral, intraespinal o por inhalación. Un protocolo de dosis preferido es uno que implica la dosis máxima o frecuencia de *dosis* que impide que se produzcan efectos secundarios no convenientes significativos. Generalmente, una dosis semanal total es una dosis de al menos 0,05 µg/kg de peso corporal, más generalmente de al menos 0,2 µg/kg, mucho más generalmente de al menos 0,5 µg/kg, normalmente de al menos 1 µg/kg, más normalmente de al menos 10 µg/kg, mucho más normalmente de al menos 100 µg/kg, preferentemente de al menos 0,2 mg/kg, más preferentemente de al menos 1,0 mg/kg, mucho más preferentemente de al menos 2,0 mg/kg, optimamente de al menos 10 mg/kg, más optimamente de al menos 25 mg/kg y mucho más optimamente de al menos 50 mg/kg (véase, por ejemplo, Yang, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold, et al. (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu, et al. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144). La dosis deseada de un agente terapéutico de molécula pequeña, por ejemplo, un péptidomimético, un producto natural o un compuesto químico orgánico, es casi la misma que para un anticuerpo o polipéptido, en moles/kg.

Como se usa en la presente memoria, los términos "inhibir" o "tratar" o "tratamiento" incluyen un aplazamiento del desarrollo de los síntomas asociados a enfermedad autoinmunitaria o inmunopatología inducida por patógenos y/o una reducción en la gravedad de dichos síntomas que se desarrollarán o se espera que se desarrollen. Los términos incluyen además mejorar los síntomas relacionados con enfermedad autoinmunitaria o inmunopatología inducida por patógenos no controlados o no deseados existentes, impedir que se produzcan síntomas adicionales, y mejorar o impedir las causas subyacentes de dichos síntomas. Por tanto, los términos indican que se ha otorgado un resultado beneficioso a un sujeto vertebrado con una enfermedad inflamatoria.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-TSLP o fragmento del mismo, que, cuando se administra sola o en combinación con un agente terapéutico adicional a una célula, a un tejido o a un sujeto, es eficaz para impedir o mejorar la enfermedad autoinmunitaria o la enfermedad o afección asociada a la inmunopatología inducida por patógenos o el avance de la enfermedad. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a la cantidad del compuesto que es suficiente para mejorar los síntomas, por ejemplo, el tratamiento, la curación, la prevención o mejoría de la afección médica en cuestión, o para aumentar la velocidad del tratamiento, la curación, la prevención o mejoría de dichas afecciones. Cuando se aplica a un principio activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a ese principio solo. Cuando se aplica a una combinación, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya se administren en combinación, en serie o de manera simultánea. Una cantidad eficaz de producto terapéutico disminuirá los síntomas normalmente al menos un 10 %; habitualmente al menos un 20 %; preferentemente al menos aproximadamente un 30 %; más preferentemente al menos un 40 % y mucho más preferentemente al menos un 50 %.

Los métodos para la administración conjunta o tratamiento con un anticuerpo anti TSLP o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citocina, un esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación (o cualquiera de dichos agentes mencionados en la presente memoria) forman parte de la presente invención, véanse, generalmente, por ejemplo, Hardman, et al. (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las composiciones

farmacéuticas de los mismos de la invención, también pueden contener otros agentes inmunosupresores o inmunomoduladores. Se puede emplear cualquier agente inmunosupresor adecuado, incluyendo, pero sin limitación, agentes quimioterapéuticos, corticoesteroides, ciclosporina, tacrolimus (es decir, FK-506), sirolimus, interferones, receptores de citoquinas solubles (p. ej., sTNRF y sIL-1R), agentes que neutralizan la actividad de las citoquinas (p.ej., inflixmab, adalimumab, golimumab, etanercept), micofenolato de mofetilo, 15-desoxiespergualina, talidomida, 5  
glatiramer, azatioprina, leflunomida, ciclofosfamida, metotrexato y similares. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos también pueden proporcionarse con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o composición farmacéutica del mismo de la presente invención. La composición farmacéutica también puede emplearse con otras modalidades terapéuticas tales como fototerapia y radiación. La presente divulgación incluye 10 composiciones que comprenden cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y cualquier segundo agente terapéutico (por ejemplo, como se menciona en la presente memoria, por ejemplo, en donde el anticuerpo o fragmento se formula independientemente del segundo agente terapéutico o en donde se formula junto con dicho agente).

15 Como sujetos típicos utilizados en medicina veterinaria, de laboratorio o de investigación, se incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayas, caballos y seres humanos.

#### VII. Producción de anticuerpos

20 Para la producción recombinante de los anticuerpos de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican las dos cadenas se aíslan y se insertan en uno o más vectores replicables para la clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse 25 específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Se dispone de una gran cantidad de vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de lo siguiente: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. En una realización, las cadenas tanto ligera como pesada del anticuerpo anti TSLP humanizado de la presente invención, se expresan a partir del mismo vector, por 30 ejemplo, un plásmido o un vector de adenovirus.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, los anticuerpos se expresan en cultivo en células de mamífero o de insecto, tales como células de ovario de hámster chino (CHO, siglas del inglés *Chinese Hamster Ovary*), células embrionarias de riñón humano (HEK, siglas del inglés *Human Embryonic Kidney*) 293, 35 células NSO de mieloma de ratón, células de riñón de cría de hámster (BHK, del inglés *Baby Hamster Kidney*), células de tejido ovárico de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). En una realización de la invención, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, se producen en células fúngicas tales como células de *Pichia*, células de *Pichia pastoris*, células de *Pichia finlandica*, células de *Pichia trehalophila*, células de *Pichia koclamae*, células de *Pichia membranaefaciens*, células de *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), células de *Pichia opuntiae*, células de *Pichia thermotolerans*, células de *Pichia salictaria*, células de *Pichia guercuum*, células de *Pichia pijperi*, células de *Pichia stiptis*, células de *Pichia methanolica*, células de *Saccharomyces cerevisiae*, células de *Saccharomyces*, células de *Hansfinula polymorpha*, células de *Kluyveromyces*, células de *Kluyveromyces lactis*, células de *Candida albicans*, células de *Aspergillus nidulans*, células de *Aspergillus niger*, células de *Aspergillus oryzae*, células de *Trichoderma reesei*, células de *Chryso sporium lucknowense*, células de *Fusarium*, células de *Fusarium gramineum*, células de *Fusarium venenatum* o células de *Neurasporea crassa*. 45

En una realización, los anticuerpos segregados por células CHO se recuperan y purifican mediante métodos cromatográficos estándar, tales como cromatografía de proteína A, de intercambio catiónico, de intercambio aniónico, de interacción hidrófoba y de hidroxipatita. Los anticuerpos resultantes se concentran y conservan en 50 acetato de sodio 20 mM, pH 5,5.

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención se producen en levaduras de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO2005/040395. Resumiendo, los vectores que codifican las cadenas ligeras o pesadas individuales de un anticuerpo de interés se introducen en diferentes células haploides de levadura, por ejemplo, 55 apareando diferentes tipos de la levadura *Pichia pastoris*, cuyas células haploides de levadura son, opcionalmente, auxótrofos complementarios. Las células de levadura haploides transformadas se pueden emparejar o fusionar para dar una célula de levadura diploide capaz de producir cadenas tanto pesadas como ligeras. La cepa diploide puede entonces segregar el anticuerpo completamente ensamblado y biológicamente activo. Los niveles de expresión relativos de las dos cadenas pueden optimizarse, por ejemplo, usando vectores con diferentes números de copias, usando promotores transcripcionales de intensidades diferentes, o induciendo la expresión de promotores inducibles que conducen la transcripción de los genes que codifican una o ambas cadenas. 60

En una realización, las respectivas cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti TSLP se introducen en células haploides de levadura para crear una biblioteca de cepas de levadura haploide de un tipo de apareamiento que expresa una pluralidad de cadenas ligeras, y una biblioteca de cepas de levadura haploide de un tipo de apareamiento diferente que expresa una pluralidad de cadenas pesadas. Estas bibliotecas de cepas haploides se 65

pueden aparear (o fusionar como esferoplastos) para producir una serie de células de levadura diploides que expresan una biblioteca combinatoria de anticuerpos que comprende las diversas permutaciones posibles de cadenas ligeras y pesadas. La biblioteca combinatoria de anticuerpos puede explorarse para determinar si alguno de los anticuerpos tiene propiedades superiores (por ejemplo, una mayor afinidad por TSLP) a las de los anticuerpos originales. Véase, por ejemplo, el documento WO2005/040395.

Los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos de dominio humano en los que partes de un dominio variable de anticuerpo están unidas en un polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0110941. Dichos agentes de dominio único que tienen un peso molecular bajo proporcionan numerosas ventajas en cuanto a facilidad de síntesis, estabilidad y vía de administración.

#### VIII. Usos

La presente invención proporciona anticuerpos anti TSLP genomodificados para su uso en métodos de tratamiento y diagnóstico de trastornos inflamatorios (por ejemplo, en mamíferos tales como seres humanos).

En una realización preferida, el trastorno inflamatorio es asma.

En otra realización preferida, el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio alérgico. En una realización preferida, el trastorno inflamatorio alérgico es rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica o dermatitis atópica.

La presente divulgación proporciona el uso de anticuerpos anti TSLP genomodificados para la preparación de un medicamento para el tratamiento y diagnóstico de fibrosis, enfermedad inflamatoria intestinal, linfoma de Hodgkin, infecciones respiratorias u otras infecciones causadas por virus, artritis reumatoide, o cualquier otro trastorno caracterizado por inflamación en el lugar donde se produce la lesión.

La invención se entiende mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar las invenciones a las realizaciones específicas.

Se pueden efectuar muchas modificaciones y variaciones de esta invención, como será obvio para los expertos en la materia. Las realizaciones específicas descritas en la presente memoria se ofrecen solo como ejemplos, y la invención estará limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas y no estará limitada por las realizaciones específicas que se han presentado como ejemplo en la presente memoria.

#### Ejemplo 1

##### Métodos generales

Se describen métodos estándar en biología molecular (Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). También aparecen métodos estándar en Ausbel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley y Sons, Inc. Nueva York, NY, que describen la clonación en células bacterianas y la mutagénesis de ADN (Vol. 1), la clonación en células de mamífero y de levadura (Vol. 2), la expresión de glucoconjugados y proteínas (Vol. 3), y bioinformática (Vol. 4).

Se describen métodos de purificación de proteínas, incluida la inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización (Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley y Sons, Inc., Nueva York). Se describe el análisis químico, la modificación química, la modificación postraduccional, la producción de proteínas de fusión, la glucosilación de proteínas (véase, por ejemplo, Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley y Sons, Inc., Nueva York; Ausubel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley y Sons, Inc., NY, págs. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; págs. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., págs. 384-391). Se describe la producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales (Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley y Sons, Inc., Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, citado anteriormente). Se dispone de técnicas estándar para caracterizar las interacciones entre ligando/receptor (véase, por ejemplo, Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York).

Se describen anticuerpos y diacuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, Malecki et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson y Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231:177-189; y la patente de Estados Unidos N.º 4.946.778). Se proporcionan anticuerpos bifuncionales (véase, por ejemplo, Mack, et al. (1995) *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 92:7021-7025; Carter (2001) J. Immunol. Methods 248:7-15; Volkel, et al. (2001) Protein Engineering 14:815-823; Segal, et al. (2001) J. Immunol. Methods 248:1-6; Brennan, et al. (1985) Science 229:81-83; Raso, et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:27623; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Traunecker, et al. (1991) EMBO J. 10:3655-3659; y las patentes de Estados Unidos N.º 5.932.448, 5.532.210 y 6.129.914).

También se proporcionan anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Azzoni et al. (1998) J. Immunol. 161:3493; Kita et al. (1999) J. Immunol. 162:6901; Merchant et al. (2000) J. Biol. Chem. 74:9115; Pandey et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:38633; Zheng et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:12999; Propst et al. (2000) J. Immunol. 165:2214; Long (1999) Ann. Rev. Immunol. 17:875).

Los anticuerpos pueden conjugarse, por ejemplo, con moléculas pequeñas de fármacos, enzimas, liposomas, polietilenglicol (PEG). Los anticuerpos son útiles para fines terapéuticos, diagnósticos, en kits o para otros fines, e incluyen anticuerpos acoplados, por ejemplo, a colorantes, radioisótopos, enzimas o metales, por ejemplo, oro coloidal (véase, por ejemplo, Le Doussal et al. (1991) J. Immunol. 146:169-175; Gibellini et al. (1998) J. Immunol. 160:3891-3898; Hsing y Bishop (1999) J. Immunol. 162:2804-2811; Everts et al. (2002) J. Immunol. 168:883-889).

Se dispone de métodos de citometría de flujo, incluyendo la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, siglas del inglés *Fluorescence Activated Cell Sorting*) (véase, por ejemplo, Owens et al. (1994) Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, John Wiley y Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) Flow Cytometry, 2ª ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley y Sons, Hoboken, NJ). Se dispone de reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluyendo cebadores y sondas de ácido nucleico, polipéptidos y anticuerpos, para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico (Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, MO).

Se describen métodos estándar de histología del sistema inmunitario (véase, por ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986) Human Thymus: Histopathology and Pathology, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, et al. (2000) Color Atlas of Histology, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila, PA; Louis, et al. (2002) Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, Nueva York, NY).

Se dispone de paquetes de programas informáticos y de bases de datos para determinar, por ejemplo, fragmentos antigénicos, secuencias líder, plegamiento de proteínas, dominios funcionales, sitios de glucosilación y alineamientos de secuencias (véase, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); Paquete GCG Wisconsin (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne et al. (2000) Bioinformatics 16: 741-742; Menne et al. (2000) Bioinformatics Applications Note 16:741-742; Wren et al. (2002) Comput. Methods Programs Biomed. 68:177-181; von Heijne (1983) Eur. J. Biochem. 133:17-21; von Heijne (1986) Nucleic Acids Res. 14:4683-4690).

## Ejemplo 2

Optimización de secuencia de anticuerpos anti TSLP para evitar problemas de desamidación

En la publicación de patente internacional WO2008/076321 se desveló un anticuerpo humanizado que se unía a TSLP humana y de cino. Tras un análisis más detallado de esta secuencia, el inventor identificó que la CDR-H2 de este anticuerpo, que contenía dos restos de asparagina (N) en las posiciones 61 y 63 de la SEQ ID: 4 del documento WO2008/076321, podría desamidarse posiblemente y, por lo tanto, interrumpir la estructura del anticuerpo, causando posiblemente problemas graves no deseados que afectan a la seguridad y/o eficacia del anticuerpo. Para evitar estos problemas, los inventores crearon un anticuerpo mejorado que impidió estos problemas de desamidación, aunque conservó la afinidad por la TSLP humana y de cino e impidió otros problemas relacionados con la inmunogenicidad. Este anticuerpo mejorado comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de la SEQ ID NO: 7. La CDR-H2 de esta secuencia de aminoácidos corresponde a la SEQ ID NO: 2.

En la figura 1 se proporciona un alineamiento de la SEQ ID NO: 11 de la presente solicitud con la SEQ ID NO: 14 del documento WO2008/076321 (es decir, un alineamiento de las cadenas pesadas del anticuerpo reivindicado en la presente memoria y el anticuerpo desvelado en el documento WO2008/076321. En la Figura 1, la "Secuencia 1" corresponde a la SEQ ID NO: 11 de la presente solicitud y la "Secuencia 2" corresponde a la SEQ ID NO: 14 del documento WO2008/076321. En el anticuerpo reivindicado en la presente memoria, la asparagina (N) en la posición 61 de la SEQ ID NO: 14 del documento WO2008/076321 se cambió por alanina (A) y la asparagina en la posición 63 de la SEQ ID NO: 14 se cambió por lisina (K). Estos cambios se realizaron para impedir la posible desamidación de estos restos. Adicionalmente, la lisina (K) en la posición 65 de la SEQ ID NO: 4 del documento WO2008/076321 se cambió por glutamina (Q). Este cambio se realizó para disminuir las posibilidades de crear inmunogenicidad. Se realizó un cambio adicional en la posición 72 de la SEQ ID NO: 14 del documento WO2008/076321, donde una treonina (T) se cambió por una alanina (A). Este cambio se realizó para mejorar la afinidad de unión del anticuerpo.

De manera sorprendente, se descubrió que los cambios realizados en la CDR-H2 no afectaban sustancialmente a la afinidad de unión del anticuerpo resultante.

Un vector que contenía los genes que codifican la cadena pesada y ligera del anticuerpo desvelado en la presente memoria se depositó en la ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, el 17 de noviembre de 2009 y recibió el número de depósito PTA-10482 en la ATCC. Este depósito se realizó en las condiciones proporcionadas por el Tratado de Budapest. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las cadenas ligeras y pesadas (incluidos los péptidos señal) están en un solo plásmido, y ambos genes se expresan a partir del promotor de citomegalovirus (CMV) humano. El plásmido también contiene un gen resistente a ampicilina para la selección en células de mamífero y un gen de DHFR (dihidrofolato reductasa) para la amplificación génica.

### 10 Ejemplo 3

Determinación de la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) del anticuerpo humanizado anti TSLP humana usando tecnología KinExA

15 La constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) se determinó usando el instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Instruments Inc., www.sapidyne.com). El instrumento KinExA utiliza el principio del método de exclusión cinética basado en la medición de la concentración de anticuerpos que no forman complejo en una mezcla de anticuerpos, antígenos y complejo de anticuerpo-antígeno. La concentración de anticuerpo libre se mide exponiendo la mezcla a un antígeno inmovilizado en fase sólida durante un período de tiempo muy breve. En la práctica, esto se realiza haciendo fluir la mezcla de antígeno-anticuerpo en fase de solución por partículas recubiertas de antígeno atrapadas en una cubeta de lectura. Los datos generados por el instrumento se analizan utilizando un programa informático personalizado. Las constantes de equilibrio se calculan utilizando una teoría matemática basada en las siguientes suposiciones:

25 1. La unión sigue la ecuación de unión reversible para el equilibrio:

$$k_{on} [Ab] [Ag] = k_{off} [AbAg]$$

30 2. El anticuerpo y el antígeno se unen a una relación de 1: 1 y el anticuerpo total es igual al complejo de antígeno-anticuerpo más el anticuerpo libre.

3. La señal del instrumento está relacionada linealmente con la concentración de anticuerpos libres.

### Materiales

35 Anticuerpos:

- Anticuerpo 1: Anticuerpo precursor de rata 23B12
- Anticuerpo 2: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 del documento WO2008/076321)
- 40 • Anticuerpo 3: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 con una mutación en la posición 72 de T a A, y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 del documento WO2008/076321)
- Anticuerpo 4: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 de la presente solicitud)

45

Antígenos:

- TSLP humana recombinante

50 Antígenos biotinilados:

- TSLP humana biotinilada

Otros reactivos:

55

- partículas de PMMA, 98 micras (Sapidyne, Cat N.º 440198)
- Neutravidina (Pierce, Cat N.º 31000)
- IgG de cabra anti rata conjugada con Cy5 (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Cat. N.º 112-175-167, Lote 60306)
- 60 • IgG de cabra anti Hu conjugada con Cy5 (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Cat. No 109-175-088, lote 49069 y lote 58552)

### Condiciones experimentales:

65 Las partículas de PMMA se recubrieron con TSLP humana biotinilada de acuerdo con Sapidyne "Protocolo para recubrir partículas de PMMA con ligandos biotinilados que tienen brazos enlazadores cortos o inexistentes". Todos

los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con el manual del instrumento KinExA 3000. Todos los procesos se realizaron por duplicado.

Se utilizaron las siguientes condiciones:

- 5 Volumen de la muestra: 2 ml  
 Caudal de la muestra: 0,25 ml/min  
 Volumen de la etiqueta: 1 ml  
 Caudal de la etiqueta: 0,25 ml/min  
 10 Conc. de anticuerpo: 0,1 nM  
 Mayor conc. de antígeno: 10 nM  
 Menor conc. de antígeno: 10 pM

- 15 Se prepararon diluciones en serie de factor 2 del antígeno y se mezclaron con el anticuerpo a concentración constante. La mezcla se incubó durante 2 horas a 25° C para equilibrar.

Tabla 3  
 Valores de  $K_D$  determinados con KinExa

mAb	TSLP	Expresión	$K_D$ (pM)
Anticuerpo 1	humano	HEK293	1,1
Anticuerpo 2	humano	HEK293	7,7
Anticuerpo 3	humano	HEK293	1,6
Anticuerpo 4	humano	HEK293	3,2

#### 20 Ejemplo 4

Afinidad de anticuerpos por TSLP humana y de cino

- 25 Las actividades de unión cinética del anticuerpo precursor de rata y de los diversos anticuerpos anti TSLP humana derivados humanizados contra TSLP tanto humana (hu) como de mono cinomolgo (cino), se midieron mediante resonancia de plasmón superficial usando un sistema BIAcore T100 (BIAcore AB, Upsalla, Suecia). En una microplaca detectora CM5 (Research grade BR-1006-68), se inmovilizaron aproximadamente 100 UR de TSLP humana o de cino usando química de acoplamiento de aminas. Como tampón continuo se usó tampón HBS-EP (BR-1006-69) a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Sobre las superficies inmovilizadas de TSLP hu o cino se inyectaron anticuerpos  
 30 23B12 de rata y humanizados a diversas concentraciones que variaban entre 0,82 y 600 nM a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Después de cada ciclo de inyección, la superficie de la microplaca CM5 se regeneró usando una serie de soluciones (Glicina 10 mM, pH 1,5 y NaOH 25 mM, respectivamente) a un caudal de 75  $\mu$ l/min.

- 35 Para analizar las constantes de velocidad de asociación ( $k_a$ ) y de disociación ( $k_d$ ) y la constante de disociación de equilibrio  $K_D$ , se usaron sensorgramas de unión de sustracción de fondo. Los conjuntos de datos resultantes se ajustaron a los de un modelo de analito bivalente utilizando el programa informático BIAevaluation (versión 1.0). En la Tabla 4 se muestra la  $K_D$  determinada de los diversos anticuerpos. Los resultados de los experimentos individuales se muestran en líneas distintas.

40

Tabla 4  
 Análisis BIAcore

TSLP	KD (pM)			
	Anticuerpo 1	Anticuerpo 2	Anticuerpo 3	Anticuerpo 4
humana	141	No determinada	No determinada	172
humana	130	150	128	No determinada
humana	No determinada	No determinada	No determinada	155, 142, 339, 170, 153
humana*	No determinada	No determinada	No determinada	339
humana*, **	No determinada	No determinada	No determinada	299
cino	159	No determinada	No determinada	138, 80, 115
cino	No determinada	No determinada	No determinada	127
cino**	No determinada	No determinada	No determinada	381

(continuación)

Análisis BIAcore				
TSLP	KD (pM)			
	Anticuerpo 1	Anticuerpo 2	Anticuerpo 3	Anticuerpo 4
* En este experimento particular se usó TSLP adquirida en R&D y expresada en <i>E. coli</i> . Los otros experimentos se realizaron con TSLP expresada en células HEK293.				
** Estos experimentos se realizaron a 37° C. Los restantes experimentos se realizaron a temperatura ambiente.				
Anticuerpo 1: Anticuerpo precursor de rata 23B12				
Anticuerpo 2: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 del documento WO2008/076321)				
Anticuerpo 3: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 con una mutación en la posición 72 de T a A; y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 del documento WO2008/076321)				
Anticuerpo 4: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 de la presente solicitud)				

## Ejemplo 5

## Bioensayo de proliferación para la evaluación del anticuerpo anti TSLP neutralizante

5

La capacidad de los diversos anticuerpos anti TSLP para neutralizar biológicamente la TSLP humana y de cinco se evaluó aplicando bioensayos de proliferación de corta duración con células que expresaban receptores de TSLP humana y de cinco recombinantes. Las células transfectantes Ba/F3-TSLPR-IL7Ra proliferan en respuesta a TSLP y la respuesta puede inhibirse con un anticuerpo anti TSLP neutralizante. Cada anticuerpo se tituló frente a una concentración de TSLP elegida dentro de la región lineal de la curva de respuesta a las dosis de TSLP, cerca de la meseta y por encima de la CE<sub>50</sub> de la TSLP. La proliferación, o su ausencia, se mide a través de medios colorimétricos usando azul Alamar, un colorante indicador de crecimiento basado en la detección de actividad metabólica. La capacidad de un anticuerpo para neutralizar la TSLP se evaluó a través de su valor de CE50 o a través de la concentración de anticuerpo que induce inhibición máxima al 50 % de la proliferación de TSLP.

15

Los transfectantes Ba/F3 se mantuvieron en medio RPMI-1640, suero bovino fetal al 10 %, 2-mercaptoetanol 50 µM, L glutamina 2 mM, 50 ug/ml de penicilina-estreptomomicina y 10 ng/ml de IL 3 de ratón.

20

Los bioensayos de proliferación de Ba/F3 se realizaron en medio RPMI-1640, suero bovino fetal al 10 %, 2-mercaptoetanol 50 µM, L-glutamina 2 mM y 50 µg/ml de penicilina-estreptomomicina.

25

El ensayo se realizó en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon 3072 o similar). En todas las preparaciones de reactivos y suspensiones celulares se utilizaron medios de bioensayo apropiados. El volumen de ensayo era de 150 µl por pocillo. Las titulaciones de un anticuerpo anti TSLP se preincubaron con TSLP durante 30-60 minutos a temperatura ambiente, tiempo durante el cual se prepararon las células. Después de la preincubación del anticuerpo y la citocina, las células se añadieron a las placas. Las placas de bioensayo se incubaron en una cámara de cultivo tisular humidificada (37° C, CO<sub>2</sub> al 5 %) durante 40-48 horas. Después de finalizar el cultivo, se añadió azul Alamar (Biosource Cat n.º DAL1100) y se dejó que se revelase durante 8-12 horas. La absorbancia se leyó a 570 nm y 600 nm (lector de microplaca VERSAmax, Molecular Probes) y se obtuvo una DO<sub>570-600</sub>. Se recomendó hacerlo por duplicado o por triplicado.

30

Las células se usaron en un estado de crecimiento saludable, generalmente a densidades de 3-8 x 10<sup>5</sup>/ml. Las células se contaron, se sedimentaron, se lavaron dos veces en medio de bioensayo y se suspendieron a la densidad adecuada para sembrar en placas.

35

La TSLP se preparó a la concentración de trabajo y al primer pocillo se le añadió una cantidad de 75 µl. Se realizaron diluciones en serie de 1: 3 titulando a 25:50 µl en medio de bioensayo en los pocillos, dejando 50 µl/pocillo. Para la siembra en placa, las células se suspendieron a la densidad apropiada 100 µl por pocillo.

40

El anticuerpo se preparó a la concentración de trabajo y al primer pocillo se le añadió una cantidad de 75 µl. Se realizaron diluciones en serie de 1: 3 titulando a 25:50 µl en medio de bioensayo en los pocillos, dejando 50 µl por pocillo. A los pocillos que contenían el anticuerpo titulado, se añadió TSLP a la concentración apropiada a 50 µl por pocillo. Para la siembra en placa, las células se suspendieron a la densidad apropiada a 50 µl por pocillo, y se añadieron después de la preincubación del anticuerpo y la citocina.

45

Usando el programa informático GraphPad Prism 3.0, la absorbancia se representó gráficamente frente a la concentración de citocinas o anticuerpos y se determinaron los valores de CE50 usando regresión no lineal (ajuste de curva) de la respuesta a la dosis sigmoidal.

50

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 5. Los resultados de los experimentos individuales se muestran en líneas distintas.

Tabla 5

Inhibición de la proliferación				
TSLP	CE 50 (µg/ml)			
	Anticuerpo 1	Anticuerpo 2	Anticuerpo 3	Anticuerpo 4
humana	0,022	No determinada	No determinada	0,041
humana	0,025	0,092	0,054	No determinada
humana	0,014	No determinada	No determinada	0,024
humana*	0,083	No determinada	No determinada	0,215, 0,137
cino	0,064	No determinada	No determinada	0,117, 0,077
cino	0,122	No determinada	No determinada	0,158
cino	0,054	No determinada	No determinada	0,067

\* En este experimento particular se usó TSLP adquirida en R&D y expresada en *E. coli*. Los otros experimentos se realizaron con TSLP expresada en células HEK293.  
 Anticuerpo 1: Anticuerpo precursor de rata 23B12  
 Anticuerpo 2: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 del documento WO2008/076321)  
 Anticuerpo 3: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 14 con una mutación en la posición 72 de T a A; y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 16 del documento WO2008/076321)  
 Anticuerpo 4: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 de la presente solicitud)

- 5 En la Tabla 5 se presenta un resumen de los resultados, incluidos los valores promedio, y en la Tabla 6 se proporcionan la DE (desviación estándar). (Para calcular los valores proporcionados en la Tabla 6, solo se usaron los valores obtenidos usando TSLP expresada en células HEK293).

Tabla 6

	Bioensayo (pM) con transfectantes Ba/F3	
	hTSLP (DE)	cTSLP (DE)
Anticuerpo 1	120 (37)	528 (242)
Anticuerpo 4	214 (80)	691 (274)

#### 10 Ejemplo 6

Actividad neutralizante de anti TSLP sobre la producción de TARC, inducida por TSLP, por células dendríticas primarias humanas

- 15 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de capas leucoplaquetarias obtenidas de donantes de sangre sanos (Stanford Medical School Blood Center, Stanford, CA) mediante centrifugación con Ficoll y con la técnica MACS (siglas del inglés *Magnetic-Activated Cell Sorting*, clasificación de células activadas por magnetismo), se obtuvieron células dendríticas Cd11c<sup>+</sup> (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) usando selección negativa seguido de clasificación de células usando la técnica FACS. Se obtuvieron células de linaje negativo (Lin<sup>-</sup>) mediante empobrecimiento, a través de MACS, de linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, glóbulos rojos y monocitos de CMSP  
 20 usando perlas magnéticas recubiertas con mAb anti CD3 humano de ratón (OKT3, DNAX) y mAb anti CD 16 de ratón e IgG de cabra anti ratón (Miltenyi Biotech), y usando perlas magnéticas directamente recubiertas con los mAb anti CD19, CD56 y CD14 (Miltenyi Biotech). Posteriormente, las células Lin<sup>-</sup> se tiñeron con anti CD4 conjugado con TC (Caltag, Burlingame, CA), anti CD11c conjugado con PE (ficoeritrina) y anti CD3, CD14, CD19, CD56, CD16 y  
 25 CD20 conjugado con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (todos ellos de BD Biosciences, San Diego, CA) y CD CD11c<sup>+</sup> clasificadas en un clasificador Vantage FACSorter™ (BD Biosciences) a una pureza > 99 % de células CD11c<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup>.

- 30 Las CD (células dendríticas) CD11c<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> se cultivaron inmediatamente después de la clasificación en RPMI (Mediatech, Herndon, VA) que contenía FCS al 10 % y piruvato al 1 % (Mediatech), HEPES (Invitrogen, Grand Island, NY) y penicilina-estreptomina (Mediatech). Las células se sembraron a 0,5 x 10<sup>6</sup>/ml en placas de fondo plano de 96 pocillos en presencia de medio solo, TSLP (15 ng/ml, DNAX), o en una combinación de TSLP y el mAb anti TSLP neutralizante (clon 23B12) o un anticuerpo monoclonal anti TSLPR o un control de isotipo IgG2a de rata  
 35 (R&D Systems, Mineápolis, MN). Después de 24 horas de cultivo, se recogieron los sobrenadantes de cultivo de las CD, se conservaron congelados a -20° C y se analizaron para determinar los niveles de proteína TARC mediante un ensayo ELISA (R&D Systems).

En la Tabla 7 se muestra un resumen de los resultados. Los resultados de los experimentos individuales se muestran en líneas distintas.

40

Tabla 7

TSLP	CE 50 (µg/ml)	
	Anticuerpo 1	Anticuerpo 4
humana	0,12	0,16
humana	0,0069	0,0077
humana	0,031	0,060
humana (R&D)*	0,050	0,102, 0,126
humana (R&D)*	0,113	0,067, 0,173
humana (R&D)*	0,228	0,424
humana (R&D)*	0,404	0,164

\* En estos experimentos se usó TSLP adquirida en R&D y expresada en *E. coli*. Los otros experimentos se realizaron con TSLP expresada en células HEK293.  
 Anticuerpo 1: Anticuerpo precursor de rata 23B12  
 Anticuerpo 4: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 de la presente solicitud)

En la Tabla 7 se presenta un resumen de los resultados, incluidos los valores promedio, y en la Tabla 8 se proporcionan la DE (desviación estándar).

5

Tabla 8

	Bioensayo (pM) Producción de TARC por CD humanas	
	hTSLP (DE)	hTSLP* (DE)
Anticuerpo 1	345 (389)	1312 (1025)
Anticuerpo 4	492 (502)	1161 (843)

\* En estos experimentos se usó TSLP adquirida en R&D expresada en *E. coli*. Los otros experimentos se realizaron con TSLP expresada en células HEK293.

## Ejemplo 7

- 10 Actividad neutralizante de anticuerpos anti TSLP sobre la producción de proteína MDC (quimiocina derivada de macrófagos) inducida por TSLP por esplenocitos de mono cinomolgo

A partir de bazo de mono cinomolgo, se prepararon suspensiones totales de esplenocitos, rompiendo el tejido y haciéndolo pasar a través de un tamiz tisular de acero inoxidable de malla 50 (Bellco) y después a través de un filtro celular de nailon de 70 micrómetros (BD Falcon). Las suspensiones celulares se lavaron en DPBS por centrifugación y los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de lisis ACK (BioWhittaker) precalentado a 37° C,

15

para efectuar la lisis de glóbulos rojos y se incubó durante 5 minutos a 37° C. Las células se diluyeron en DPBS, se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio de cultivo.

20

Los esplenocitos se cultivaron en RPMI (Mediatech, Herndon, VA) que contenía FCS al 10 % y piruvato al 1 % (Mediatech), HEPES (Invitrogen, Grand Island, NY) y penicilina-estreptomina (Mediatech). Las células se sembraron a  $1,0 \times 10^6$ /ml en placas de fondo plano de 96 pocillos en presencia de medio solo, TSLP (0,1 ng/ml), o en una combinación de TSLP y el mAb anti TSLP neutralizante (Anticuerpo 1 o Anticuerpo 4). Después de 120 h de cultivo, se recogieron los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos, se conservaron congelados a -20° C y se analizaron para determinar los niveles de proteína MDC mediante un ensayo ELISA (R&D Systems).

25

En la Tabla 9 se muestra un resumen de los resultados. Los resultados de los experimentos individuales se muestran en líneas distintas.

30

Tabla 9

TSLP	CI 50 (ug/ml)	
	Anticuerpo 1	Anticuerpo 4
cino	0,012	0,012
cino	0,030	0,028, 0,008
cino	0,018	0,054
cino	0,033	0,023

Anticuerpo 1: Anticuerpo precursor de rata 23B12  
 Anticuerpo 4: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y la cadena ligera de la SEQ ID NO: 12 de la presente solicitud)

Como resultará evidente para los expertos en la materia, se pueden efectuar muchas modificaciones y variaciones de esta invención. Las realizaciones específicas descritas en la presente memoria se ofrecen solo como ejemplos, y

la invención estará limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas y no estará limitada por las realizaciones específicas que se han presentado como ejemplo en la presente memoria.

5 La mención de las publicaciones o documentos anteriores no pretende constituir una admisión de que alguno de los anteriores constituya una técnica anterior relevante, ni constituye ninguna admisión en cuanto a los contenidos o la fecha de estas publicaciones o documentos.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> CORPORACIÓN SCHERING  
 <120> ANTICUERPO ANTI TSLP GENOMODIFICADO  
 <130> BP2009.7093  
 15 <140>  
 <141>  
 <150> 61/297.008  
 20 <151> 21/01/2010  
 <150> 61/258.051  
 <151> 04/11/2009  
 25 <160> 16  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 30 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <221> fuente  
 <223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 <400> 1  
 Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Ala Met His  
 40 1 5 10  
 <210> 2  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"  
 50 <400> 2  
 Thr Phe Ile Pro Leu Leu Asp Thr Ser Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Gly  
 55 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>

ES 2 784 123 T3

<221> fuente  
 <223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 3

5

Met Gly Val Thr His Ser Tyr Val Met Asp Ala  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

15

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Ile Ser Val His  
 1 5 10

20

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

30

<400> 5

Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
 1 5

35

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

40

<400> 6

Gln Gln Thr Phe Ser Leu Pro Tyr Thr  
 1 5

45

<210> 7  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

55

<400> 7

ES 2 784 123 T3

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

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

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

Gly Thr Phe Ile Pro Leu Leu Asp Thr Ser Asp Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 8  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Ile Ser  
 20 25 30

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

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

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

15



ES 2 784 123 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Thr Phe Ile Pro Leu Leu Asp Thr Ser Asp Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Met Gly Val Thr His Ser Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys  
 450

<210> 12  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <221> fuente

ES 2 784 123 T3

<223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Ile Ser  
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

5

<210> 13  
 <211> 1350

ES 2 784 123 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<221> fuente  
<223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 13

caggtgcagc	tggtgcagtc	tggcgccgaa	gtgaagaaac	ctggcgccctc	cgtgaagggtg	60
tcctgcaagg	cctccggcta	catcttcacc	gactacgcca	tgcactgggt	ccgccaggct	120
ccaggacagg	gcctggaatg	gatgggcacc	ttcatccctc	tgctggacac	ctctgactac	180
gcccagaaat	tccagggcag	agtgaccatg	accgccgaca	cctccacctc	caccgcctac	240
atggaactgc	ggtccctgag	atccgacgac	accgccgtgt	actactgcmc	ccggatgggc	300
gtgacacact	cctacgtgat	ggacgcttgg	ggccagggca	ccctggtcac	cgtgtcctcc	360
gctagcacca	agggcccttc	cgtgttcctc	ctggcccctt	cctccaagtc	tacctctggc	420
ggcaccgctg	ctctgggctg	tctggccaag	gactacttcc	ctgagcctgt	gacagtctct	480
tggaactctg	gcgccctgac	ctccggcgtg	cacaccttcc	ctgccgtgct	gcagtctagt	540
ggcctgtact	ccctgtcctc	cgtggtcaca	gtgccttcat	catccctggg	caccagacc	600
tacatctgca	acgtgaacca	caagccttcc	aacaccaagg	tggacaagaa	ggtggagcct	660
aagtctgcg	acaagaccca	cacctgtcct	ccatgccctg	cccctgagct	gctgggcgga	720
ccctccgtgt	tctgttccc	tcctaagcct	aaggacaccc	tgatgatctc	ccggaccctc	780
gaagtgacct	gcgtgggtgt	ggacgtgtcc	cacgaggacc	cagaagtgaa	gttcaattgg	840
tacgtggacg	gcgtggaggt	gcacaacgcc	aagaccaagc	ctcgggagga	acagtacaac	900
tccacctacc	gggtggtgtc	cgtgctgacc	gtgctgcacc	aggactggct	gaacggcaaa	960
gaatacaagt	gcaagggtgtc	caacaaggcc	ctgcctgccc	ctatcgaaaa	gaccatctcc	1020
aaggccaagg	gccagccaag	agaacctcag	gtgtacaccc	tgctccctc	tcgggacgag	1080
ctgaccaaga	accagggtgtc	cctgacatgc	ctggccaagg	gcttctacc	ttccgatatc	1140
gccgtggagt	gggagtctaa	cggccagcct	gagaacaact	acaagaccac	ccctcctgtg	1200
ctggactccg	acggctcctt	cttctgttac	tccaagctga	ccgtggacaa	gtcccgggtg	1260
cagcagggca	acgtgttctc	ctgctccgtg	atgcacgagg	ccctgcacaa	ccactacacc	1320
cagaagtccc	tgccctgtc	tcctggcaag				1350

10

<210> 14  
<211> 642  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<221> fuente

<223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 14

```

gagatcgtgc tgaccagtc ccctggcacc ctgtctctgt ctcccggcga gagagccacc      60
ctgtcctgcc gggcctccca gcctatctcc atctccgtgc actggtatca gcagaagcca      120
ggacaggccc ctcggtctgt gatctacttc gcttctcagt ctatctctgg catccctgac      180
cggttctccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccctctcccg gctggaacct      240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag accttctccc tgccttacac cttcggccag      300
ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctcctt ccgtgttcat cttcctctcc      360
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tctgtctgtt gctgctgaa caacttctac      420
cctcgggagg ccaagggtgca gtggaaggtg gacaacgcc tgcagtccgg caactcccag      480
gaatccgtca ccgagcagga ctccaaggac tctacctact ccctgtcctc caccctgacc      540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgctt gcgaagtgac ccaccagggc      600
5 ctgtcatctc cagtgactaa gtctttcaac cggggcgagt gc                          642

```

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 15

```

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
1           5           10           15

```

Val Leu Ser

<210> 16

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /observación = "Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 16

```

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

```

Met Arg Cys

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a TSLP humana, que comprende:
- 5 una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7; y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.
- 10 2. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12.
- 15 3. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno puede expresarse a partir del vector depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482.
- 20 4. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno es un fragmento de anticuerpo de unión a TSLP seleccionado del grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub> y un diacuerpo.
- 25 5. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 6.
- 30 8. Un método para producir el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende:
- cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 7 en medio de cultivo en condiciones en las que se expresa la secuencia de ácido nucleico, produciendo así el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las regiones variables de cadena ligera y pesada; y
- 35 recuperar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la célula huésped o del medio de cultivo.
9. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en un método para el tratamiento de trastornos inflamatorios mediante la supresión de una respuesta inmune en un sujeto humano, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo en una cantidad eficaz para bloquear la actividad biológica de TSLP.
- 40 10. Una composición que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en combinación con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 45 11. El uso del anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para la preparación de un medicamento para tratar trastornos inflamatorios, fibrosis, enfermedad inflamatoria intestinal o linfoma de Hodgkin.
- 50 12. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o el uso de la reivindicación 11 en donde el trastorno inflamatorio es rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica o dermatitis atópica.
- 55 13. El vector de expresión depositado en la ATCC con el n.º de depósito PTA-10482.
14. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 13.

```

Secuencia 1      20  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLLDTSDY
Secuencia 2      1  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLLDTSDY
*****
Secuencia 1      80  AQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGGQGLVTVSS
Secuencia 2      61  NQNFKGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGGQGLVTVSS
* * *****
Secuencia 1     140  ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGAL TSGVHTFPAVLQSS
Secuencia 2     121  ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVMNSGAL TSGVHTFPAVLQSS
*****
Secuencia 1     200  GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNWNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
Secuencia 2     181  GLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNWNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
*****
Secuencia 1     260  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
Secuencia 2     241  PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
*****
Secuencia 1     320  STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
Secuencia 2     301  STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
*****
Secuencia 1     380  LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
Secuencia 2     361  LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
*****
Secuencia 1     440  QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Secuencia 2     421  QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
*****

```

FIG.1