



No. 12-124175-00000-0000

Fecha: 2012-07-24 17:02:02 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 242

Act. 411 PRESENTACION Folios: 240

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **"PROTEÍNAS DE ENLACE A CD127"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 16/28**

71. SOLICITANTE **GLAXO GROUP LIMITED**

DOMICILIO **MIDDLESEX, INGLATERRA.**

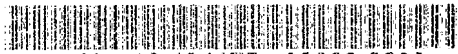
74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **24 JUL 2012**



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO


No. 12-124175- -00000-0000

Fecha: 2012-07-24 17:02:02 Dep. 2020 DiR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 242

Act. 411 PRESENTACION Folios: 240

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL-PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/022507	Fecha 26/01/11
Publicación Internacional No.		WO 2011/094259 A3	Fecha 04/08/11
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCION:		
"PROTEÍNAS DE ENLACE A CD127"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
C07K 16/28			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
4. GLAXO GROUP LIMITED.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex UB6 0NN, Inglaterra.	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		Middlesex	E-MAIL jllcco@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO			NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Inglaterra	Inglaterra y Gales
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. KIRBY		Ian	Reino Unido
2. TAYLOR		Alexander, H.	Estados Unidos de América
3. WEBB		Thomas, Matthew	Reino Unido
4. XUE		Yu	China
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: jllcco@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Reino Unido		Hertfordshire	Gunnels Wood, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY, Reino Unido.
Estados Unidos de América	Pennsylvania	King Of Prussia	709 Swedeland Road, King Of Prussia, PA 19406, Estados Unidos de América.
Reino Unido		Hertfordshire	Gunnels Wood, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY, Reino Unido.
Estados Unidos de América	Pennsylvania	King Of Prussia	709 Swedeland Road, King Of Prussia, PA 19406, Estados Unidos de América.
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P.53.215
DIRECCIÓN		Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO 3264270
CIUDAD		Bogotá	E-MAIL jllcco@lloredacamacho.com
PAÍS		Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América		US	61/299,010	10/01/28
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar	
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 12-0069480	Fecha 09-07-2012	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>			
 ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante C.C. 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
☒ Descripción N° de folios: 205 ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 30 ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 4 ☒ Resumen. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. ☐ Arte final 12 x 12. ☒ Anexo formato digital.		☒ Poderes, si fuera el caso. ☒ Declaraciones. (Declaración bajo las reglas 4.17(ii) y 51bis.1(a)(ii) que acreditan el traspaso de los inventores al solicitante). ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

PROTEÍNAS DE ENLACE A CD127

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a proteínas de enlace a antígeno, en particular inmunoglobulinas, que se enlazan específicamente a la cadena α del receptor de IL-7 humano (CD127). La invención también se refiere a procedimientos de tratamiento de enfermedades o trastornos con dichas proteínas, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas y a procedimientos para su elaboración. Otros aspectos de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción siguiente.

Antecedentes de la Invención

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante que afecta al sistema nervioso central. En la esclerosis múltiple (EM), se cree que están implicadas células inmunes inflamatorias infiltrantes en la destrucción de oligodendrocitos, que son las células responsables de crear y mantener una capa grasa, conocida como vaina de mielina. La esclerosis múltiple (EM) da como resultado el adelgazamiento o la pérdida completa de la mielina. Cuando se pierde la mielina, las neuronas ya no pueden conducir eficazmente sus señales eléctricas, conduciendo a numerosas disfunciones neurológicas. Los individuos con esclerosis múltiple (EM) producen linfocitos T autorreactivos que participan en la formación de lesiones inflamatorias a lo largo de la vaina de mielina de las fibras nerviosas. El líquido cefalorraquídeo de

pacientes con esclerosis múltiple (EM) activa contiene linfocitos T activados que infiltran el tejido cerebral y causan lesiones inflamatorias características, destruyendo la mielina. Aunque los síntomas de esclerosis múltiple y el transcurso de la enfermedad pueden variar de una persona a otra, existen tres formas de la enfermedad — esclerosis múltiple (EM) recidivante-remitente, esclerosis múltiple progresiva secundaria y esclerosis múltiple (EM) progresiva primaria.

En las fases tempranas de la esclerosis múltiple (EM), se producen ataques inflamatorios a lo largo de intervalos cortos de actividad patológica intensamente aumentada. Estos episodios van seguidos de periodos de recuperación y remisión. Durante el periodo de remisión, la hinchazón local en la lesión del sistema nervioso se resuelve, las células inmunes se vuelven menos activas o inactivas, y las células productoras de mielina remielinizan los axones. La señalización nerviosa mejora y la discapacidad causada por la inflamación se vuelve menos grave o desaparece en su totalidad. Esta fase de la enfermedad se denomina esclerosis múltiple (EM) recidivante-remitente (EMRR). Sin embargo, las lesiones no cicatrizan completamente. Algunas permanecen como lesiones “crónicas”, que habitualmente tienen una región de núcleo desmielinizada que carece de células inmunes. Con el tiempo, las células en el centro de dichas lesiones mueren en su mayoría, aunque la inflamación continúa con frecuencia en sus bordes. El cerebro puede adaptarse bien a la pérdida de algunas neuronas y la discapacidad permanente puede no aparecer durante

muchos años. Sin embargo, más del 50 por ciento de los pacientes con esclerosis múltiple (EM) entran finalmente en una fase de deterioro progresivo denominada esclerosis múltiple progresiva secundaria (EMPS). En esta fase, la enfermedad ya no responde bien a fármacos modificadores de enfermedad y las discapacidades del paciente empeoran a un ritmo constante. La destrucción de neuronas desde temprano en el transcurso natural de la esclerosis múltiple (EM) sugiere que las discapacidades progresivas de la EMPS podrían ser el resultado de una pérdida neuronal acumulada que finalmente supera las capacidades compensatorias del cerebro. La esclerosis múltiple progresiva primaria es un tipo de esclerosis múltiple en la que no hay recaídas, pero durante un periodo de años, existe una pérdida gradual de funciones físicas y cognitivas.

El objetivo del tratamiento en pacientes con esclerosis múltiple recidivante-remitente es reducir la frecuencia y gravedad de las recaídas (y por lo tanto, evitar exacerbaciones) así como evitar o posponer el inicio de la fase progresiva de la enfermedad. Para conseguir este objetivo, especialmente en el pasado, se han usados fármacos inmunomoduladores o inmunosupresores, pero nunca han encontrado una aceptación generalizada debido a su eficacia limitada y a su considerable toxicidad. Por ejemplo, se han realizado grandes ensayos controlados aleatorizados con éxito con interferón beta-1a, interferón beta-1b y acetato de glatirámico.

Tanto las respuestas alteradas de linfocitos T autoinmunes como la

disfunción de la red reguladora del sistema inmune desempeñan un papel importante en patologías autoinmunes humanas, tales como la esclerosis múltiple (EM) y la artritis reumatoide (Kuchroo y colaboradores, (2002) Annu. Rev. Immunol. 20: 101-123; Sospedra y Martin (2005) Annu. Rev. Immunol. 23: 683-747; Toh y Miossec (2007) Curr. Opin. Rheumatol. 19: 284-288).

Aunque la etiología y la patogénesis de la esclerosis múltiple (EM) continúan siendo desconocidas, generalmente se considera una patología autoinmune en la que se cree que los linfocitos T autorreactivos de potencial patógeno, tales como los linfocitos T_H1 y T_H17 , desempeñan un papel importante. Existen pruebas de que estos linfocitos T efectores se activan *in vivo* durante el proceso patológico y son atribuibles a la inflamación del sistema nervioso central (SNC). También existen pruebas de que estos linfocitos T median la destrucción de células que expresan mielina en lesiones de EAE y esclerosis múltiple (EM) durante la fase activa de la enfermedad. Por otro lado, los linfocitos T reguladores (T_{reg}) que normalmente mantienen los linfocitos T_H1 y T_H17 patógenos bajo control, son deficientes en pacientes con esclerosis múltiple (EM), inclinando adicionalmente el sistema inmune hacia un estado proinflamatorio.

Tres grupos separados han descrito recientemente los resultados de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en todo el genoma explorando un total de 17.947 donantes con o sin esclerosis múltiple (EM). Después de explorar 334.923 SNP, encontraron una asociación altamente significativa

($P_{\text{global}} = 2,9 \times 10^{-7}$) de un SNP codificante no sinónimo en la cadena alfa del receptor de IL-7 humano (IL-7R α) con susceptibilidad a esclerosis múltiple (EM). El SNP corresponde a un cambio de T a C en el exón 6 de CD127 (también conocido como IL-7R α). Este cambio aumenta la posibilidad de saltarse el exón 6 durante el corte y empalme de ARN, dando como resultado una forma soluble de CD127. Además, las expresiones de ARN de CD127 e IL-7 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con esclerosis múltiple (EM) son significativamente superiores respecto a LCR de pacientes con otros trastornos neurológicos.

Se sabe que la IL-7 y el receptor de IL-7 (IL-7R) desempeñan un papel importante en el desarrollo de linfocitos T y linfocitos B y en la homeostasis, principalmente en el entorno del timo. De hecho, las células estromales tímicas, el timo fetal y la médula ósea son sitios de producción de IL-7. El receptor de IL-7 constituido por dos subunidades, CD127 y una cadena común (cadena gama o γ_c) que está compartida por los receptores de IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21.

El CD127 también se conoce como receptor alfa de IL-7 (IL-7R α) y p90 IL-7R. El CD127 humano (número de referencia SwissProt P16871) tiene un total de 459 aminoácidos (20 de secuencia de señal). Comprende una región extracelular de 219 aminoácidos, una región transmembrana de 25 aminoácidos y una región intracelular de 195 aminoácidos. La numeración de los residuos dentro del CD127, como se usa en el presente documento (por ejemplo, para la descripción de epítomos de anticuerpos)

se basa en la proteína de longitud completa, incluyendo los residuos de secuencia de señal. El CD127 puede existir en cuatro isoformas, la isoforma H20 (número de referencia SwissProt P16871-1) tiene la secuencia de aminoácidos siguiente (incluyendo la secuencia de señal):

5 MTILGTTFGM VFSLLQVVSG ESGYAQNGDL EDAELDDYSF
SCYSQLEVNG SQHSLTCAFE
DPDVNTTNLE FEICGALVEV KCLNFRKLQE IYFIETKKFL LIGKSNICVK
VGEKSLTCKK
10 IDLTTIVKPE APFDLSVIYR EGANDFVVTF NTSHLQKKYV KVLMDVDVAYR
QEKDENKWITH
VNLSSTKLTL LQRKLQPAAM YEIKVRSIPD HYFKGFWSEW
SPSYFRTPE INNSSGEMDP
ILLTISILSF FSVALLVILA CVLWKKRIKP IVWPSLPDHK KTLHLCKKP
15 RKNLNVSFNP
ESFLDCQIHR VDDIQARDEV EGFLQDTFPQ QLEESEKQRL
GGDVQSPNCP SEDVVVTPES
FGRDSSLTCL AGNVSACDAP ILSSSRSLDC RESGKNGPHV
YQDLLLSLGT TNSTLPPPF
20 LQSGILTLNP VAQGQPILTS LGSNQEEAYV TMSSFYQNN (SEQ ID N°: 1)

El CD127 también se encuentra en el receptor de linfopoyetina derivada del estroma tímico (TSLP). El receptor de TSLP es un heterodímero de CD127 y factor 2 tipo receptor de citoquina (CRLF2).

25 La enlace de IL-7 al IL-7R activa múltiples rutas de señalización

incluyendo la activación de las JAK cinasas 1 y 3, que conduce a la fosforilación y activación de Stat5. Esta ruta es crucial para la supervivencia de precursores de linfocitos T que se desarrollan en el timo, debido a que la activación de Stat5 es necesaria para la inducción de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la prevención de la entrada de la proteína pro-apoptótica Bax en la mitocondria. Otra ruta mediada por IL-7R es la activación de la PI3 cinasa, que da como resultado la fosforilación de la proteína pro-apoptótica Bad y su retención en el citoplasma. El CD127 se expresa en linfocitos T de memoria y en reposo periféricos. El mecanismo de la regulación por IL-7 de la supervivencia de linfocitos T y la homeostasis y la fuente de IL-7 en la periferia no se entiende completamente. Además, su papel potencial en la diferenciación y función de linfocitos T patógenos en enfermedades autoinmunes se ha estudiado poco y en gran medida se desconoce. Existen unos pocos informes que sugieren que la IL-7 puede contribuir a la patogénesis de enfermedades autoinmunes.

Recientemente, Liu y colaboradores (Liu y colaboradores (2010) Nature Medicine 16: 191-197) han descrito el papel de IL-7 en la supervivencia y expansión de T_H17. Se han descrito anticuerpos anti-CD127 murinos (incluyendo los anticuerpos anti-CD127 1A11 y 6A3) y su papel en el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM) y otras enfermedades autoinmunes en la solicitud PCT número PCT/US2009/053136, cuyo contenido se incorpora expresamente y en su totalidad en el presente documento por referencia.

Es deseable aislar y desarrollar anticuerpos monoclonales adicionales que se enlacen a y/o inhiban el efecto biológico del CD127 humano. Es probable que dichos anticuerpos sean terapéuticamente útiles en el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM) y otras enfermedades y trastornos inflamatorios y autoinmunes, particularmente aquellos en los que se han implicado linfocitos T_H17 patógenos.

Breve Descripción de la Invención

La invención proporciona proteínas de enlace a antígeno que se enlazan específicamente a CD127. Las proteínas de enlace a antígeno pueden usarse en procedimientos terapéuticos, en particular, en el tratamiento o la prevención de enfermedades en las que están implicados linfocitos T_H17 patógenos. Las proteínas de enlace a antígeno pueden enlazarse a CD127 e inhibir, por ejemplo, neutralizar, la función biológica de CD127.

En un primer aspecto, la invención proporciona proteínas de enlace a antígeno, tales como anticuerpos, que comprenden de una a seis de las regiones determinantes de complementariedad siguientes, o variantes de las mismas:

- (i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2
- (ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3
- (iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o en cualquiera de las SEQ ID N°: 133-SEQ ID N°: 138,
- (iv) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5

(v) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6

(vi) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7

En otro aspecto, la invención proporciona proteínas de enlace a antígeno, tales como anticuerpos, que comprenden de una a seis de las regiones determinantes de complementariedad siguientes, o variantes de las mismas:

(i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 39

(ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 40

(iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 41

(iv) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 42

(v) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 43

(vi) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 44

En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno es un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. El anticuerpo puede comprender una o más CDR (de SEQ ID N°: 2-7 ó 39-44 de un anticuerpo donador) en un marco de anticuerpo aceptor. La región de marco del anticuerpo aceptor puede ser un anticuerpo humano.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una o más de las regiones determinantes de complementariedad siguientes:

(i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2

(ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3

(iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o en cualquiera de la SEQ ID N°: 132-SEQ ID N°: 137,

en donde además el anticuerpo comprende cuando menos uno de: un residuo de lisina en la posición 66, un residuo de fenilalanina, metionina, isoleucina, leucina o valina en la posición 69 y un residuo de valina, arginina, alanina o leucina en la posición 71 de la región variable de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat).

En una modalidad, el anticuerpo humanizado comprende una leucina en posición 69. En una modalidad, el anticuerpo humanizado comprende una valina en posición 71. En una modalidad, el anticuerpo humanizado comprende una leucina en posición 69 y una valina en posición 71. En una modalidad, el anticuerpo humanizado comprende una lisina en posición 66, una leucina en posición 69 y una valina en posición 71. Con la excepción de las mutaciones de los puntos anteriormente mencionados, la región variable de cadena pesada puede tener una secuencia de marco de una región variable de línea germinal humana. Por ejemplo, en una modalidad, la región variable de cadena pesada se deriva a partir del marco humano de IGHV1_2 (SEQ ID N°: 116).

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende uno o dos de las regiones determinantes de complementariedad siguientes:

(i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2

(ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3

(iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o en cualquiera de la SEQ ID N°: 132-SEQ ID N°: 137,

En un marco V_H en donde el marco V_H se deriva a partir de un marco V_H de línea germinal humana, y comprende cuando menos uno de: un
5 residuo de lisina en la posición 66, un residuo de fenilalanina, metionina, isoleucina, leucina o valina en la posición 69 y un residuo de valina, arginina, alanina o leucina en la posición 71 de la región variable de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat). En una modalidad, el
10 marco V_H humano es el marco humano de IGHV1_2 (SEQ ID N°: 116).

El anticuerpo de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 (SEQ ID N°: 2) y CDRH3 (SEQ ID N°: 4); CDRH2 (SEQ ID N°: 3) y CDRH3 (SEQ ID N°: 4); CDRH1 (SEQ ID N°: 2) y CDRH2 (SEQ ID N°: 3); o CDRH1 (SEQ ID N°: 2), CDRH2 (SEQ
15 ID N°: 3) y CDRH3 (SEQ ID N°: 4). El anticuerpo puede comprender una región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID N°: 10-17 (1A11.H0 V_H a 1A11.H7 V_H). En una modalidad, el anticuerpo humanizado comprende una región variable de cadena pesada de la SEQ ID N°: 13 (1A11.H3 V_H). En cualquiera de estas modalidades, la CDRH3 de la SEQ
20 ID N°: 4 puede sustituirse con la CDRH3 como se expone en cualquiera de las SEQ ID N°: 132-SEQ ID N°: 137. Como alternativa, la región variable de cadena pesada de la SEQ ID N°: 13 puede comprender una o más sustituciones seleccionadas de N98D, N98E, F100bE, F100bH, F100bI y
25 F100bV (Kabat). En otra modalidad, la región variable de cadena pesada

tiene una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID N°: 121, 123, 125, 127 129 ó 131. En una modalidad, la región variable de cadena pesada se empareja con una región variable de cadena ligera de SEQ ID N°: 16.

5 La invención también proporciona un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una o más de las regiones determinantes de complementariedad siguientes:

- (i) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5
- (ii) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6
- 10 (iii) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7

en donde además el anticuerpo comprende cuando menos uno de: un residuo de lisina en la posición 45, un residuo de prolina en posición 46, un residuo de triptófano en posición 47, un residuo de valina en posición 58, un residuo de valina en posición 60, un residuo de serina en posición 15 70 y un residuo de tirosina o fenilalanina en la posición 71 de la región variable de la cadena ligera (numeración de acuerdo con Kabat).

En una modalidad, el anticuerpo humanizado comprende un residuo de prolina en la posición 46. En una modalidad, el anticuerpo comprende un residuo de tirosina en posición 71. En una modalidad, el anticuerpo 20 comprende un residuo de prolina en posición 46 y un residuo de tirosina en posición 71.

El anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 (SEQ ID N°: 5) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7); 25 CDRL2 (SEQ ID N°: 6) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7); CDRL1 (SEQ ID N°: 5) y

CDRL2 (SEQ ID N°: 6); o CDRL1 (SEQ ID N°: 5), CDRL2 (SEQ ID N°: 6) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7). El anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera de cualquiera de las SEQ ID N°: 18-27 (1A11.L0 V_k a 1A11.L9 V_k). En una modalidad, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera de la SEQ ID N°: 22 (1A11.L4 V_k).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende, una, dos o las tres regiones determinantes de complementariedad siguientes:

- (i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2
- (ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3
- (iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o en cualquiera de las SEQ ID N°: 132-SEQ ID N°: 137,

en donde además el anticuerpo comprende cuando menos uno de: un residuo de lisina en posición 66, un residuo de fenilalanina, metionina, isoleucina, leucina o valina en posición 69 y una valina, arginina, alanina o leucina en la posición 71 de la región variable de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat);

y una región variable de cadena ligera que comprende una, dos o las tres regiones determinantes de complementariedad siguientes:

- (i) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5
- (ii) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6
- (iii) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7

en donde además el anticuerpo comprende cuando menos uno de:

un residuo de lisina en posición 45, un residuo de prolina en posición 46, un residuo de triptófano en posición 47, un residuo de valina en posición 58, un residuo de valina en posición 60, un residuo de serina en posición 70 y un residuo de tirosina o fenilalanina en la posición 71 de la región variable de la cadena ligera (numeración de acuerdo con Kabat).

El anticuerpo puede comprender cualquier combinación de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3, incluyendo de una CDR de cadena pesada y una CDR de cadena ligera a las seis de dichas CDR (es decir, las 3 CDR de cadena pesada y las 3 CDR de cadena ligera). En una modalidad, el anticuerpo comprende las seis CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3.

En una modalidad, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad siguientes:

(i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2
(ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3
(iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o en cualquiera de las SEQ ID N°: 133-SEQ ID N°: 138,
y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad siguientes:

(iv) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5
(v) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6
(vi) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7

en donde además el anticuerpo comprende un residuo de leucina en la posición 69 de la región variable de la cadena pesada y un residuo de prolina en la posición 46 de la región variable de la cadena ligera.

5 En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 (1A11.H3 V_H) o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13, 10 o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID N°: 121, 123, 125, 127, 129 ó 131, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22 (1A11.L4 V_K), o una 15 secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la secuencia de aminoácidos de 20 la SEQ ID N°: 22.

En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 114 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75 por 25 ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior,

del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 144 o de la SEQ ID N°: 118. En modalidades particulares, la cadena pesada comprende una o más sustituciones seleccionadas de N98D, N98E, F100bE, F100bH, F100bI y F100bV (Kabat). En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 115 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 115. En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 114 ó 118, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 144 ó 118 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 115 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 115. Una modalidad particular comprende una proteína de enlace a antígeno que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID N°: 118 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID N°: 115.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de enlace a antígeno que comprende una o más de:

(i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2 o una CDR variante de la misma

10 (ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3 o una CDR variante de la misma

(iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o una CDR variante de la misma, o una CDRH3 como se expone en cualquiera de las SEQ ID N°: 132-SEQ ID N°: 137,

15 (iv) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5 o una CDR variante de la misma,

(v) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6 o una CDR variante de la misma,

20 (vi) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7 o una CDR variante de la misma, comprende además un marco de cadena pesada que tiene cuando menos uno de los residuos siguientes:

(a) Val, Ile o Gly en la posición 2

(b) Leu o Val en la posición 4

25 (c) Leu, Ile, Met o Val en la posición 20

- 5 (d) Cys en la posición 22
- (e) Thr, Ala, Val, Gly o Ser en la posición 24
- (f) Gly en la posición 26
- (g) Trp o Tyr en la posición 47
- (h) Ile, Met, Val o Leu en la posición 48
- (i) Ile, Leu, Phe, Met o Val en la posición 69
- (j) Arg, Val, Ala o Leu en la posición 71
- (k) Ala, Leu, Val, Tyr o Phe en la posición 78
- 10 (l) Leu o Met en la posición 80
- (m) Tyr o Phe en la posición 90
- (n) Cys en la posición 92
- (o) Arg, Lys, Gly, Ser, His o Asn en la posición 94,
- y/o un marco de cadena ligera que tiene cuando menos uno de
- 15 los residuos siguientes:
- (p) Ile en la posición 2
- (q) Leu en la posición 4
- (r) Cys en la posición 23
- 20 (s) Trp en la posición 35
- (t) Tyr en la posición 36
- (u) Tyr o Phe en la posición 71
- (v) Cys en la posición 88
- (w) Phe en la posición 98,
- 25 en donde la proteína de enlace a antígeno es capaz de enlazarse a

CD127.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender cualquier combinación de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3, incluyendo de una CDR a las seis de dichas CDR (SEQ ID N°: 2-7). En una
5 modalidad, la proteína de enlace de antígeno comprende las seis de dichas CDR (SEQ ID N°: 2-7).

En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende tanto la región de marco de cadena pesada como las regiones de marco de
10 cadena ligera que se han descrito anteriormente.

En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno es un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo humanizado o humano, o un fragmento de enlace a antígeno del mismo.

Una o más CDR variantes de este aspecto de la invención pueden
15 comprender:

- (a) una variante de CDRH1 (SEQ ID N°: 2), en la que:
 - i. el residuo de tirosina en la posición 32 se sustituye por isoleucina, histidina, fenilalanina, treonina, asparagina, cisteína, ácido glutámico o ácido aspártico;
20
 - ii. el residuo de treonina en la posición 33 se sustituye por una tirosina, alanina, triptófano, glicina, leucina o valina,
 - iii. el residuo de metionina en la posición 34 se sustituye por isoleucina, valina o triptófano; y/o
 - 25 iv. el residuo de asparagina en la posición 35 se sustituye

por histidina, ácido glutámico, glutamina, serina, tirosina o treonina;

(b) una variante de CDRH2 (SEQ ID N°: 3), en la que:

i. el residuo de leucina en la posición 50 se sustituye por arginina, ácido glutámico, triptófano, tirosina, glicina, glutamina, valina, asparagina, lisina o alanina;

ii. el residuo de isoleucina en la posición 51 se sustituye por leucina, valina, treonina, serina o asparagina;

iii. el residuo de asparagina en la posición 52 se sustituye por asparagina, leucina, serina o tirosina;

iv. el residuo de tirosina en la posición 53 se sustituye por alanina, glicina, serina, lisina, treonina o asparagina;

v. la asparagina en la posición 54 se sustituye por serina, treonina, lisina, asparagina o glicina;

vi. la valina en la posición 56 se sustituye por tirosina, arginina, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, serina o alanina; y/o

vii. la serina en la posición 58 se sustituye por lisina, asparagina, treonina, arginina, glicina, fenilalanina o tirosina;

(c) una variante de CDRH3 (SEQ ID N°: 4) en la que valina en posición 102 se sustituye por tirosina, histidina, isoleucina, serina, ácido aspártico o glicina;

(d) una variante de CDRL1 (SEQ ID N°: 5) en la que:

i. la serina en la posición 29 se sustituye por una valina; y/o;

ii. la metionina en la posición 33 se sustituye por una leucina, y/o;

(e) una variante de CDRL3 (SEQ ID N°: 7) que comprende una o más de las sustituciones siguientes:

5

i. la glutamina en posición 89 se sustituye por leucina;

ii. el ácido glutámico en posición 90 se sustituye por glutamina;

iii. el triptófano en posición 91 se sustituye por tirosina; y/o

10

iv. la tirosina en posición 93 se sustituye por serina o arginina.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender una región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID N°:10-17 (1A11.H0 V_H a 1A11.H7 V_H) o una región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID N°: 121, 123, 125, 127, 129 ó 131. En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 13 (1A11.H3 V_H). La proteína de enlace a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera de cualquiera de las SEQ ID N°: 18-27 (1A11.L0 V_K a 1A11.L9 V_K). En una modalidad, la proteína de enlace de antígeno comprende una región variable de cadena ligera de la SEQ ID N°: 22 (1A11.L4 V_K).

20

En una modalidad particular, la proteína de enlace a antígeno comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 13 (1A11.H3 V_H), y una región variable de cadena ligera de SEQ ID N°: 22

25

(1A11.L4 Vκ). En otra modalidad, la proteína de enlace de antígeno comprende una cadena pesada de SEQ ID N°: 114 o SEQ ID N°: 118, particularmente la SEQ ID N°: 118, y una cadena ligera de SEQ ID N°: 115. La cadena pesada puede comprender además cualquiera de las

5 sustituciones siguientes: N98D, N98E, F100bE, F100bH, F100bI y F100bV (Kabat).

En otra modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende una o más mutaciones puntuales dentro de la CDRH3, y la proteína de enlace

10 de antígeno tiene una afinidad de enlace superior por IL-7R que la proteína de enlace a antígeno que carece de dicha mutación. Por ejemplo, en una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende una CDRH3 como se expone en las SEQ ID N°: 132-137. En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende una región variable de cadena pesada como

15 se expone en las SEQ ID N°: 121, 123, 125, 127, 129 ó 131.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de enlace a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada como se expone en la:

- 20
- (a) SEQ ID N°: 11
 - (b) SEQ ID N°: 12
 - (c) SEQ ID N°: 13
 - (d) SEQ ID N°: 14
 - (e) SEQ ID N°: 15
 - 25 (f) SEQ ID N°: 16

- (g) SEQ ID N°: 17
- (h) SEQ ID N°: 121
- (i) SEQ ID N°: 123
- (j) SEQ ID N°: 125
- 5 (k) SEQ ID N°: 127
- (l) SEQ ID N°: 129
- (m) SEQ ID N°: 131,

o un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad del
10 70 por ciento o más con una de las SEQ ID N°: 11 a 17, siendo la proteína
de enlace a antígeno capaz de enlazarse a CD127.

En una modalidad, el dominio variable de cadena pesada tiene una
identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85
por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o
15 superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con una
de las SEQ ID N°: 11 a 17.

En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende un
dominio variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID N°: 13,
o un dominio variable de cadena pesada que tiene una identidad del 70 por
20 ciento o superior, del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior,
del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o
superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la
SEQ ID N°: 13.

25 En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno tiene una

cadena pesada que tiene una identidad del 70 por ciento o superior, del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la SEQ ID N°: 115 o
5 SEQ ID N°: 118.

En una modalidad, la cadena pesada, o el dominio variable de cadena de pesada, es una variante de una de las SEQ ID N°: 11 a 17, 121, 123, 125, 127, 129, 131, y en la que el grado de variación constituido por
10 uno o más de:

- i. Val, Ile o Gly en la posición 2
- ii. Leu o Val en la posición 4
- iii. Leu, Ile, Met o Val en la posición 20
- iv. Thr, Ala, Val, Gly o Ser en la posición 24
- 15 v. Trp o Tyr en la posición 47
- vi. Ile, Met, Val o Leu en la posición 48
- vii. Ile, Leu, Phe, Met o Val en la posición 69
- viii. Arg, Val, Ala o Leu en la posición 71
- 20 ix. Ala, Leu, Val, Tyr o Phe en la posición 78
- x. Leu o Met en la posición 80
- xi. Tyr o Phe en la posición 90; y
- xii. Arg, Lys, Gly, Ser, His o Asn en la posición 94.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de enlace a
25 antígeno que comprende un dominio variable de cadena ligera como se

expone en la:

- (a) SEQ ID N°: 19
- (b) SEQ ID N°: 20
- (c) SEQ ID N°: 21
- 5 (d) SEQ ID N°: 22
- (e) SEQ ID N°: 23
- (f) SEQ ID N°: 24
- (g) SEQ ID N°: 25
- 10 (h) SEQ ID N°: 26
- (i) SEQ ID N°: 27

o un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad del 70 por ciento o más con una de las SEQ ID N°: 19 a 27, en donde la proteína de enlace a antígeno es capaz de enlazarse a CD127.

15 En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende un dominio variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID N°: 22, o un dominio variable de cadena ligera que tiene una identidad del 70 por ciento o más con la SEQ ID N°: 22.

20 En una modalidad, el dominio variable de cadena ligera tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con una de las SEQ ID N°: 19 a 17.

25 En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno tiene una

cadena ligera que tiene una identidad del 70 por ciento o superior, del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la SEQ ID N°: 115.

5 La invención contempla cualquier emparejamiento de los dominios variables de cadena pesada y ligera descritos. En una modalidad, por lo tanto, la invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que comprende una cualquiera de las combinaciones de dominios variables

10 de cadena pesada y ligera siguientes: un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 11 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un

15 dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95

20 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

25 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 12 (o una

secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
5 cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90
10 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 13 (o una
15 secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
20 cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90
25 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°:

19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

5 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 14 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o
10 SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

20 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 15 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o
25 SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o

superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 16 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27); un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 17 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las

SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 121 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 123 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por

ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 125 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

5 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 127 (o una
secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por
ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,
del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o
superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID
N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o
10 SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o
superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90
por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o
superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°:
19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID
15 N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 129 (o una
secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por
ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,
del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o
20 superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID
N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o
SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o
25 superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90

por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27); o

5 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 131 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
10 cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90
15 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22, SEQ ID N°: 23, SEQ ID N°: 24, SEQ ID N°: 25, SEQ ID N°: 26 o SEQ ID N°: 27).

20 En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la secuencia expuesta en la SEQ
25

ID N°: 13, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 22.

En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID N°: 13 y un dominio variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID N°: 22.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de enlace a antígeno que comprende una o más de las regiones determinantes de complementariedad siguientes:

(i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2 o una CDR variante de la misma

(ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3 o una CDR variante de la misma

(iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o una CDR variante de la misma, o una CDRH3 como se expone en cualquiera de las SEQ ID N°: 132-SEQ ID N°: 137,

(iv) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5 o una CDR variante de la misma

(v) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6 o una CDR variante de la misma

(vi) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7 o una CDR variante de la misma

en donde cuando menos una de dichas CDR es una CDR variante, y en donde dicha proteína de enlace a antígeno es capaz de enlazarse a CD127.

En una modalidad, la proteína de enlace de antígeno comprende cuando menos la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6, o una variante de la misma. En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno comprende cuando menos la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4, o una CDR variante de la misma. La CDR variante de este aspecto de la invención puede comprender:

(f) una variante de CDRH1 (SEQ ID N°: 2), en la que:

i. el residuo de tirosina en la posición 32 se sustituye por isoleucina, histidina, fenilalanina, treonina, asparagina, cisteína, ácido glutámico o ácido aspártico;

ii. el residuo de treonina en la posición 33 se sustituye por una tirosina, alanina, triptófano, glicina, leucina o valina,

iii. el residuo de metionina en la posición 34 se sustituye por isoleucina, valina o triptófano; y/o

iv. el residuo de asparagina en la posición 35 se sustituye por histidina, ácido glutámico, glutamina, serina, tirosina o treonina;

(g) una variante de CDRH2 (SEQ ID N°: 3) en la que:

i. el residuo de leucina en la posición 50 se sustituye por

arginina, ácido glutámico, triptófano, tirosina, glicina, glutamina, valina, asparagina, lisina o alanina;

ii. el residuo de isoleucina en la posición 51 se sustituye por leucina, valina, treonina, serina o asparagina;

5 iii. el residuo de asparagina en la posición 52 se sustituye por asparagina, leucina, serina o tirosina;

iv. el residuo de tirosina en la posición 53 se sustituye por alanina, glicina, serina, lisina, treonina o asparagina;

10 v. la asparagina en posición 54 se sustituye por serina, treonina, lisina, asparagina o glicina;

vi. la valina en posición 56 se sustituye por tirosina, arginina, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, serina o alanina; y/o

15 vii. la serina en posición 58 se sustituye por lisina, asparagina, treonina, arginina, glicina, fenilalanina o tirosina;

(h) una variante de CDRH3 (SEQ ID N°: 4) en la que la valina en posición 102 se sustituye por tirosina, histidina, isoleucina, serina, ácido aspártico o glicina;

20 (i) una variante de CDRL1 (SEQ ID N°: 5) en la que:

i. la serina en posición 29 se sustituye por una valina; y/o;

ii. la metionina en posición 33 se sustituye por una leucina, y/o;

25 (j) una variante de CDRL3 (SEQ ID N°: 7), que comprende una o más de las sustituciones siguientes:

- i. la glutamina en posición 89 se sustituye por leucina;
- ii. el ácido glutámico en posición 90 se sustituye por glutamina;
- iii. el triptófano en posición 91 se sustituye por tirosina; y/o
- 5 iv. la tirosina en posición 93 se sustituye por serina o arginina.

En otro aspecto, la invención proporciona una proteína de enlace a antígeno que comprende:

10 un dominio variable de cadena pesada que comprende:

(i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2 o una CDR variante de la misma

(ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3 o una CDR variante de la misma

15 (iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o una CDR variante de la misma, o una CDRH3 como se expone en cualquiera de las SEQ ID N°: 132-SEQ ID N°: 137,

en un marco de dominio variable de cadena pesada que comprende cuando menos uno de:

20

(a) Val, Ile o Gly en la posición 2

(b) Leu o Val en la posición 4

(c) Leu, Ile, Met o Val en la posición 20

(d) Cys en la posición 22

25

(e) Thr, Ala, Val, Gly o Ser en la posición 24

- (f) Gly en la posición 26
- (g) Trp o Tyr en la posición 47
- (h) Ile, Met, Val o Leu en la posición 48
- (i) Ile, Leu, Phe, Met o Val en la posición 69
- 5 (j) Arg, Val, Ala o Leu en la posición 71
- (k) Ala, Leu, Val, Tyr o Phe en la posición 78
- (l) Leu o Met en la posición 80
- (m) Tyr o Phe en la posición 90
- 10 (n) Cys en la posición 92
- (o) Arg, Lys, Gly, Ser, His o Asn en la posición 94,

y un dominio variable de cadena ligera que comprende:

(iv) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5 o una CDR variante de la misma

15 (v) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6 o una CDR variante de la misma

(vi) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7 o una CDR variante de la misma,

20 en un marco de dominio variable de cadena ligera que comprende cuando menos uno de:

- (a) Ile en la posición 2
- (b) Leu en la posición 4
- (c) Cys en la posición 23
- 25 (c) Trp en la posición 35

- (e) Tyr en la posición 36
- (f) Tyr o Phe en la posición 71
- (g) Cys en la posición 88
- (h) Phe en la posición 98,

5 siendo la proteína de enlace a antígeno capaz de enlazarse a CD127.

La CDR variante de este aspecto de la invención puede comprender:

(a) una variante de CDRH1 (SEQ ID N°: 2), en la que:

10 i. el residuo de tirosina en la posición 32 se sustituye por isoleucina, histidina, fenilalanina, treonina, asparagina, cisteína, ácido glutámico o ácido aspártico;

 ii. el residuo de treonina en la posición 33 se sustituye por una tirosina, alanina, triptófano, glicina, leucina o valina,

15 iii. el residuo de metionina en la posición 34 se sustituye por isoleucina, valina o triptófano; y/o

 iv. el residuo de asparagina en la posición 35 se sustituye por histidina, ácido glutámico, glutamina, serina, tirosina o treonina;

(b) una variante de CDRH2 (SEQ ID N°: 3), en la que:

20 i. el residuo de leucina en posición 50 se sustituye por arginina, ácido glutámico, triptófano, tirosina, glicina, glutamina, valina, asparagina, lisina o alanina;

25 ii. el residuo de isoleucina en posición 51 se sustituye por leucina, valina, treonina, serina o asparagina;

iii. el residuo de asparagina en posición 52 se sustituye por asparagina, leucina, serina o tirosina;

iv. el residuo de tirosina en posición 53 se sustituye por alanina, glicina, serina, lisina, treonina o asparagina;

5 v. la asparagina en posición 54 se sustituye por serina, treonina, lisina, asparagina o glicina;

vi. la valina en posición 56 se sustituye por tirosina, arginina, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, serina o alanina; y/o

10 vii. la serina en posición 58 se sustituye por lisina, asparagina, treonina, arginina, glicina, fenilalanina o tirosina;

(c) una variante de CDRH3 (SEQ ID N°: 4) en la que la valina en posición 102 se sustituye por tirosina, histidina, isoleucina, serina, ácido aspártico o glicina;

15 (d) una variante de CDRL1 (SEQ ID N°: 5), en la que:

i. la serina en posición 29 se sustituye por una valina; y/o;

ii. la metionina en posición 33 se sustituye por una leucina, y/o;

20 (e) una variante de CDRL3 (SEQ ID N°: 7) comprende una o más de las sustituciones siguientes:

i. la glutamina en posición 89 se sustituye por leucina;

ii. el ácido glutámico en posición 90 se sustituye por glutamina;

25 iii. el triptófano en posición 91 se sustituye por tirosina; y/o

iv. la tirosina en posición 93 se sustituye por serina o arginina.

En una modalidad, la proteína de enlace de antígeno es un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo humanizado o humano, o un
5 fragmento de enlace de antígeno del mismo.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende, una, dos o las tres regiones determinantes de complementariedad siguientes:

- 10 (i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 39
(ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 40
(iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 41

en donde el anticuerpo además comprende cuando menos uno de: una valina en posición 24, una tirosina en posición 27, una serina en
15 posición 28, una isoleucina en posición 29, una treonina en posición 30, una metionina en posición 48, una glicina en posición 49, una isoleucina en posición 67, una serina en posición 68, una arginina en posición 71, una treonina en posición 73 y una fenilalanina en la posición 78 de la región variable de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat).

20 En una modalidad, el anticuerpo comprende cuando menos uno, dos, tres, cuatro o los cinco de una tirosina en posición 27, una treonina en posición 30, una metionina en posición 48, una isoleucina en posición 67 y una arginina en posición 71.

25 El anticuerpo humanizado puede comprender una región variable de

cadena pesada que comprende CDRH1 (SEQ ID N°: 39) y CDRH3 (SEQ ID N°: 41); CDRH2 (SEQ ID N°: 40) y CDRH3 (SEQ ID N°: 41); CDRH1 (SEQ ID N°: 39) y CDRH2 (SEQ ID N°: 40); o CDRH1 (SEQ ID N°: 39), CDRH2 (SEQ ID N°: 40) y CDRH3 (SEQ ID N°: 41). El anticuerpo puede comprender una región variable de cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID N°: 48-56 (6A3IGHV4_61.H1 V_H a 6A3IGHV4_61.H9) o las SEQ ID N°: 58-68 (6A3IGHV3-33.H1 V_H a 6A3 IGHV3-33.H11).

La invención también proporciona un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una, dos o las tres regiones determinantes de complementariedad siguientes:

- (iv) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 42
- (v) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 43
- (vi) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 44

comprendiendo el anticuerpo además:

(a) uno o ambos de un residuo de glutamina en la posición 45 y un residuo de lisina en la posición 70 de la región variable de la cadena ligera, o

(b) uno o más de una leucina en posición 4, una tirosina en posición 31, una metionina en posición 70, una treonina en posición 85, una tirosina en posición 94, una glicina en posición 100 y una valina en posición 104 (numeración de acuerdo con Kabat).

En una modalidad, el anticuerpo humanizado comprende tanto un residuo de glutamina en posición 45 como un residuo de lisina en posición

70. En otra modalidad, el anticuerpo comprende cada uno de una leucina en posición 4, una tirosina en posición 31, una metionina en posición 70, una treonina en posición 85, una tirosina en posición 94, una glicina en posición 100 y una valina en posición 104.

5

El anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende la CDRL1 (SEQ ID N°: 42) y CDRL3 (SEQ ID N°: 44); CDRL2 (SEQ ID N°: 43) y CDRL3 (SEQ ID N°: 44); o CDRL1 (SEQ ID N°: 42) y CDRL2 (SEQ ID N°: 43); o CDRL1 (SEQ ID N°: 42), CDRL2 (SEQ ID N°: 43) y CDRL3 (SEQ ID N°: 44). El anticuerpo puede comprender una

10

región variable de cadena ligera de cualquiera de las SEQ ID N°: 70-72 y 138 (6A3.L1 Vk, 6A3.L2 Vk, 6A3.L3 Vk y 6A3.L27 Vk).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende

15

una, dos o las tres regiones determinantes de complementariedad siguientes:

(iv) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 39

(v) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 40

(vi) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 41

20

comprendiendo el anticuerpo además cuando menos uno de: una valina en posición 24, una tirosina en posición 27, una serina en posición 28, una isoleucina en posición 29, una treonina en posición 30, una metionina en posición 48, una glicina en posición 49, una isoleucina en

25

posición 67, una serina en posición 68, una arginina en posición 71, una

treonina en posición 73 y una fenilalanina en la posición 78 de la región variable de la cadena pesada, y

una región variable de cadena ligera que comprende una, dos o las tres regiones determinantes de complementariedad siguientes:

- 5
- (i) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 42
 - (ii) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 43
 - (iii) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 44

comprendiendo el anticuerpo además:

- 10
- (a) uno o ambos de un residuo de glutamina en posición 45 y un residuo de lisina en posición 70 de la región variable de la cadena ligera; o
 - (b) uno o más de una leucina en posición 4, una tirosina en posición 31, una metionina en posición 70, una treonina en posición 85, una tirosina en posición 94, una glicina en posición 100 y una valina en
- 15 posición 104 (numeración de acuerdo con Kabat).

El anticuerpo puede comprender cualquier combinación de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3, incluyendo de una CDR de cadena pesada y una de cadena ligera a las seis de dichas CDR.

20 En una modalidad, el anticuerpo comprende: una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad siguientes:

- (i) la CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 39
- (ii) la CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 40
- 25 (iii) la CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 41

(iv) la CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 42

(v) la CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 43

(vi) la CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 44

comprendiendo el anticuerpo además cuando menos uno de:

5

(a) una valina en posición 24, una tirosina en posición 27, una serina en posición 28, una isoleucina en posición 29, una treonina en posición 30, una metionina en posición 48, una glicina en posición 49, una isoleucina en posición 67, una serina en posición 68, una arginina en posición 71, una treonina en posición 73 y una fenilalanina en la posición 78 de la región variable de la cadena pesada; y/o

10

(b)

a. cuando menos uno de un residuo de glutamina en la posición 45 y un residuo de lisina en la posición 70 de la región variable de la cadena ligera, o

15

b. uno o más de una leucina en posición 4, una tirosina en posición 31, una metionina en posición 70, una treonina en posición 85, una tirosina en posición 94, una glicina en posición 100 y una valina en posición 104 (numeración de acuerdo con Kabat).

20

La invención contempla cualquier emparejamiento de los dominios variables de cadena pesada y ligera descritos. En una modalidad, por lo tanto, la invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que comprende una cualquiera de las combinaciones de dominio variable de cadena ligera y pesada siguientes: un dominio variable de cadena

25

pesada de SEQ ID N°: 47 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un

5 dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99

10 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 48 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por

15 ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75

20 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°:

25 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 49 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72, SEQ ID N°: 73 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72, SEQ ID N°: 73 o SEQ ID N°: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 50 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°:

138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 51 (o una
secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por
ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,
5 del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o
superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID
N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75
10 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o
superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98
por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las
SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°:
138);

15 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 52 (o una
secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por
ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,
del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o
superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
20 cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID
N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75
por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o
superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98
25 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las

SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

5 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 53 (o una
secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por
ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,
del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o
superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID
10 N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75
por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o
superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98
por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las
SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°:
15 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 54 (o una
secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por
ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,
del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o
superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID
20 N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75
por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o
superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98
25 superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98

por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

5 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 55 (o una
secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por
ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,
del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o
superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
10 cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID
N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75
por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o
superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98
por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las
15 SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°:
138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 56 (o una
secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por
ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,
20 del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o
superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID
N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75
25 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o

superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

5 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 57 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
10 cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las
15 SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 58 (o una
20 secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID
25 N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75

por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 59 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 60 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID

Nº: 72 o SEQ ID Nº: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las
5 SEQ ID Nº: 69, SEQ ID Nº: 70, SEQ ID Nº: 71, SEQ ID Nº: 72 o SEQ ID Nº: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID Nº: 61 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,
10 del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID Nº: 69, SEQ ID Nº: 70, SEQ ID Nº: 71, SEQ ID Nº: 72 o SEQ ID Nº: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75
15 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID Nº: 69, SEQ ID Nº: 70, SEQ ID Nº: 71, SEQ ID Nº: 72 o SEQ ID Nº: 138);

20 un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID Nº: 62 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una
25

cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 64 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 65 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o

superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 66 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138);

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 67 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior,

del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138); y

un dominio variable de cadena pesada de SEQ ID N°: 68 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, del 99 por ciento o superior con la misma), con un dominio variable de cadena ligera de una cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138 (o una secuencia que tiene una identidad del 75 por ciento o superior, del 80 por ciento o superior, del 85 por ciento o superior, del 90 por ciento o superior, del 95 por ciento o superior, del 98 por ciento o superior, o del 99 por ciento o superior con cualquiera de las SEQ ID N°: 69, SEQ ID N°: 70, SEQ ID N°: 71, SEQ ID N°: 72 o SEQ ID N°: 138).

En una modalidad particular, se proporciona una proteína de enlace a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que tiene

la secuencia de aminoácidos como se expone en una de las SEQ ID N°: 53, 54, 55 ó 56, y una región variable de cadena ligera que tiene un secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID N°: 138.

5 La proteína de enlace puede ser un anticuerpo, en particular, un anticuerpo humanizado o humano, o un fragmento de enlace a antígeno del mismo.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo quimérico, que comprende un dominio de cadena pesada variable de SEQ ID N°: 28 y un dominio de cadena ligera variable de SEQ ID N°: 29, o un dominio de cadena pesada variable de SEQ ID N°: 73 y un dominio de cadena ligera variable de SEQ ID N°: 74.

15 La proteína de enlace a antígeno de la invención puede no inhibir la señalización de TSLP. En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno no inhibe la señalización de TSLP.

20 La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de enlace a antígeno de la presente invención. En una modalidad, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico de las SEQ ID N°: 30-38, SEQ ID N°: 75-113, SEQ ID N°: 119-120 y SEQ ID N°: 122, 124, 126, 128 y 130. La invención también proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en el presente documento, y una célula huésped recombinante que comprende un vector de expresión como se define en el presente documento. El vector de expresión puede comprender una molécula de

25

ácido nucleico de una o más de cualquiera de las SEQ ID N°: 30-38, SEQ ID N°: 75-113 y SEQ ID N°: 119-120, y SEQ ID N°: 122, 124, 126, 128 y 130. En una modalidad, el vector de expresión comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de enlace a antígeno como se ha descrito anteriormente en el presente documento. En otra modalidad, la invención proporciona una célula huésped que comprende un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en el presente documento. En una modalidad adicional, la invención proporciona un anticuerpo expresado por una célula huésped como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

La invención también proporciona un procedimiento para la producción de una proteína de enlace a antígeno de la presente invención, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de cultivar una célula huésped como se ha definido anteriormente y recuperar la proteína de enlace a antígeno.

La invención también proporciona un anticuerpo o proteína de enlace a antígeno de acuerdo con la invención que se expresa por una célula huésped que comprende una secuencia de ácido nucleico o una secuencia que codifica un anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno de acuerdo con la invención.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de enlace a antígeno de la presente invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto aquejado con una enfermedad autoinmune o inflamatoria, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar al sujeto una proteína de enlace a antígeno de la presente invención.

5

La invención también proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto aquejado de una enfermedad en la que están implicados linfocitos T_H17 patógenos, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar al sujeto una proteína de enlace a antígeno de la presente invención.

10

La invención también proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto aquejado con una enfermedad asociada con la expresión regulada por incremento de IL-17, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar al sujeto una proteína de enlace a antígeno de la presente invención.

15

En particular, la enfermedad inflamatoria o autoinmune, la enfermedad en la que están implicados linfocitos T_H17 patógenos, o la enfermedad asociada con una expresión regulada positivamente de IL17 puede ser esclerosis múltiple (EM), LES, artritis reumatoide, enfermedad de Behcet o asma. En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno de la invención será útil en un procedimiento de tratamiento de la esclerosis múltiple. Otras enfermedades que pueden tratarse mediante la administración de las proteínas de enlace a antígeno de la invención se describen en el presente documento.

20

25

La invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno como se describe en el presente documento, para su uso en el tratamiento de un sujeto aquejado de una enfermedad autoinmune o inflamatoria; una enfermedad en la que están implicados linfocitos T_H17 patógenos; o una enfermedad asociada con una expresión regulada positivamente de IL17.

La invención proporciona el uso de una proteína de enlace a antígeno como se describe en el presente documento, en la elaboración de un medicamento para su uso en el tratamiento de un sujeto aquejado de una enfermedad inflamatoria o autoinmune; una enfermedad en la que están implicados linfocitos T_H17 patógenos; o una enfermedad asociada con una expresión regulada por incremento de IL17.

Otros aspectos y modalidades de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1 muestra la citotoxicidad dependiente de complemento del mAb anti-IL7R 1A11 H3L4 en células HEK293 que expresan hIL-7R.

La Figura 2 muestra la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo del mAb anti-IL7R humanizado 1A11 H3L4 y el mAb anti-IL7R con Fc inactivado (1A11 H3L4Fc) en células HEK293 que expresan hIL-7R, en presencia de células mononucleares de sangre periférica.

Las Figuras 3A y 3B muestran la inhibición de fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 mediante 1A11 H3L4 en células mononucleares de

sangre periférica humanas proporcionadas por dos donantes separados.

Las Figuras 4A a 4D muestran la inhibición de la producción de IL-17 inducida por IL-7 en linfocitos Th17 humanos diferenciados mediante 1A11 H3L4 (en cuatro donantes diferentes).

5 Las Figuras 5A a 5E muestran que 1A11 H3L4 no influye en la inducción por TSLP de TARC (quimiocina de timo y regulada por activación).

Descripción Detallada de la Invención

10 La señalización de IL-7/IL-7R se requiere de forma crítica para la supervivencia y expansión de células T_H17 comprometidas en sistemas tanto de ratón como de seres humanos, aunque su papel en la diferenciación de T_H17 no es esencial en comparación con el de IL-6 (Liu y col, (2010) Nature Medicine 16: 191-197). De forma sorprendente, el efecto
15 *in vivo* sobre el sistema inmune mediante el antagonismo de IL-7R es altamente selectivo en EAE, un modelo animal para esclerosis múltiple, que afecta a los linfocitos T_H17 y, en menor medida, los linfocitos T_H1 predominantemente del fenotipo de memoria y linfocitos T_{reg} moderadores. Esta selectividad parece jugar un papel importante en reequilibrar la
20 relación de linfocitos T_H17 patógenos y linfocitos T_{reg} mediante antagonismo de IL-7R en EAE y puede atribuirse a la eficacia del tratamiento.

El papel de la señalización de IL-7/IL-7R en la supervivencia de
25 linfocitos T_H17 y su expansión apoya la eficacia del tratamiento de

antagonismo de IL-7R en enfermedades autoinmunes humanas, tales como esclerosis múltiple. La neutralización de IL-7 o antagonismo de IL-7R probablemente tiene ventajas terapéuticas únicas. Por un lado, el tratamiento ofrece la selectividad que distingue linfocitos T_H1 y T_H17 patógenos de linfocitos T_{reg} y células inmunes no relacionadas. Por otro lado, las ventajas terapéuticas adicionales del antagonismo de IL-7R implican su efecto selectivo en la supervivencia y expansión de T_H17 diferenciadas a diferencia de la diferenciación de T_H17 . Es concebible que la dirección a mantenimiento *in vivo* de T_H17 comprometidas frente a diferenciación de T_H17 sea más eficaz en un contexto terapéutico. La inhibición de la señalización mediada por receptor de IL-7 proporciona por lo tanto una intervención terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias.

La expresión señalización mediada por IL-7R, como se usa en el presente documento, significa el efecto biológico inducido por el complejo de receptor de IL-7 cuando se enlaza a su ligando, IL-7. La señalización por IL-7R incluye por lo tanto, sin limitación necesaria, uno o más, o todos, de fosforilación inducida por IL-7 de STAT-5, expansión inducida por IL-7 de células T_H17 y supervivencia inducida por IL-7 de células T_H17 .

Los anticuerpos murinos 1A11 y 6A3 se describen en la solicitud de patente número PCT/US2009/053136 (WO2010/017468). Estos anticuerpos se enlazan específicamente a la cadena alfa del receptor de IL-7 humano, CD127 (SEQ ID N°: 1). Los dominios variables de estos

anticuerpos se describen en SEQ ID N°: 8 y 9 (V_H, V_K 1A11, respectivamente) y SEQ ID N°: 45 y 46 (V_H, V_K 6A3, respectivamente).

La presente invención proporciona proteínas de enlace a antígeno que comprenden una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de 1A11 o 6A3 y variantes de las mismas. Las
5 proteínas de enlace a antígeno pueden enlazarse y neutralizar la señalización de IL-7R. En una modalidad, la invención proporciona anticuerpos humanizados, que comprenden de una a seis de las CDR de los anticuerpos murinos 1A11 o 6A3 (el anticuerpo donador) en un
10 anticuerpo aceptor humano.

La expresión "proteína de enlace a antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otras construcciones de proteínas, tales como dominios, que son capaces
15 de enlazarse a CD127. En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno es un anticuerpo.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio para referirse a moléculas con un dominio de tipo inmunoglobulina e incluye anticuerpos monoclonales, recombinantes,
20 policlonales, quiméricos, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados; un dominio variable sencillo, un anticuerpo de dominio, fragmentos de enlace a antígeno, fragmentos inmunológicamente eficaces, Fv de cadena sencilla, diacuerpos, TanAcids^{MR}, etc. (para un sumario de formatos de
25 "anticuerpos" alternativos véase Holliger y Hudson, Nature Biotechnology,

2005, Volumen 23, N° 9, 1126-1136).

La frase "dominio variable sencillo" se refiere a un dominio variable de proteína de enlace a antígeno (por ejemplo, V_H , V_{HH} , V_L) que se enlaza específicamente a un antígeno o epítipo independientemente de una
5 región variable o dominio diferente.

Un "anticuerpo de dominio" o "Acd" puede considerarse igual que un "dominio variable sencillo" que es capaz de enlazarse a un antígeno. Un dominio variable sencillo puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables de anticuerpo sencillos
10 de otras especies tales como Acd de V_{HH} de roedores (por ejemplo, como se desvela en el documento WO 00/29004), tiburón nodriza y *Camélido*. Los V_{HH} de *Camélido* son polipéptidos de dominio variable sencillo de inmunoglobulina que derivan de especies que incluyen camello, llama,
15 alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada desprovistos de forma natural de cadenas ligeras. Dichos dominios V_{HH} pueden humanizarse de acuerdo con técnicas convencionales disponibles en la materia y se considera que dichos dominios son
"anticuerpos de dominio". Como se usa en el presente documento V_H
20 incluye dominios V_{HH} de camélido.

Como se usa en el presente documento el término "dominio" se refiere a una estructura proteica plegada que tiene estructura terciaria independiente del residuo de la proteína. Generalmente, los dominios son
25 responsables de propiedades funcionales discretas de las proteínas y en

muchos casos pueden añadirse, retirarse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del residuo de la proteína y/o del domino. Un “domino variable sencillo” es un dominio polipeptídico plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpo.

5 Incluye por lo tanto dominios variables de anticuerpo completo y dominios variables modificados, por ejemplo, en los que se han reemplazado uno o más bucles con secuencias que no son características de dominios variables de anticuerpo o dominios variables de anticuerpo que se han truncado o comprenden prolongaciones C terminales o N terminales, así
10 como fragmentos plegados de dominios variables que conservan cuando menos la actividad de enlace y especificidad del dominio de longitud completa. Un domino puede enlazarse a un antígeno o un epítipo independientemente de un dominio o región variable diferente.

15 Puede proporcionarse un fragmento de enlace a antígeno por medio de la disposición de una o más CDR en armazones proteicos no de anticuerpo tales como un dominio. Un armazón o domino proteico no de anticuerpo es uno que se ha sometido a ingeniería de proteínas para
20 obtener un enlace a un ligando distinto de su ligando natural, por ejemplo, un dominio que es un derivado de un armazón seleccionado de: CTLA-4 (Evicuerpo); lipocalina; moléculas derivadas de Proteína A tales como dominio Z de Proteína A (Aficuerpo, SpA), dominio A (Avímero/Maxicuerpo); proteínas de choque término tales como GroEl y
25 GroES; transferrina (trans-cuerpo); proteína con repeticiones de anquirina

(DARPin); aptámero peptídico; dominio de lectina de tipo C (Tetranectina);
γ-cristalina humana y ubiquitina humana (afilinas); dominios PDZ; toxina de
escorpión; dominios de tipo kunitz de inhibidores de proteasa humanos; y
fibronectina (adnectina); que se han sometido a ingeniería de proteínas
5 para obtener enlace a un ligando distinto de su ligando natural.

CTLA-4 (Antígeno asociado con Linfocito T Citotóxico 4) es un
receptor de la familia de CD28 expresado principalmente en células T
CD4+. Su dominio extracelular tiene un pliegue Ig de tipo domino variable.
10 Los bucles que corresponden a las CDR de anticuerpos pueden sustituirse
con una secuencia heteróloga para conferir diferentes propiedades de
enlace. Las moléculas de CTLA-4 modificadas por ingeniería genética para
tener diferentes especificidades de enlace también se conocen como
Evicuerpos. Para detalles adicionales véase Journal of Immunological
15 Methods 248 (1-2), 31-45 (2001).

Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que
transportan moléculas hidrófobas pequeñas tales como esteroides, bilinas,
retinoides y lípidos. Tienen una estructura secundaria de lámina β rígida
20 con varios bucles en el extremo abierto de la estructura canónica que
puede modificarse por ingeniería genética para enlazarse a diferentes
antígenos diana. Las anticalinas tienen un tamaño entre 160 y 180
aminoácidos y derivan de lipocalinas. Para detalles adicionales véase
Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), los documentos
25 US7250297B1 y US20070224633.

Un aficuerpo es un derivado de armazón de Proteína A de *Staphylococcus aureus* que puede modificarse por ingeniería genética para enlazarse a un antígeno. El dominio constituido por un conjunto de tres hélices de aproximadamente 58 aminoácidos. Se han generado bibliotecas por selección aleatoria de residuos superficiales. Para detalles adicionales véase Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) y la Patente Europea Número EP1641818A1.

Los avímeros son proteínas multidominio derivadas de la familia del armazón de dominio A. Los dominios nativos de aproximadamente 35 aminoácidos adoptan una estructura enlazada por disulfuro definida. Se genera diversidad mediante la redistribución de la variación natural mostrada por la familia de los dominios A. Para detalles adicionales véase Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) y Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (junio de 2007).

Una transferrina es una glucoproteína de transporte en suero monomérica. Las transferrinas pueden modificarse por ingeniería genética para enlazarse a diferentes antígenos diana por inserción de secuencias peptídicas, tal como una o más CDR, en un bucle de superficie permisiva. Los ejemplos de armazones de transferrina obtenidos por ingeniería genética incluyen los Transcuerpos. Para detalles adicionales véase J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999).

Las Proteínas con Repeticiones de Anquirina Diseñadas (DARPin) derivan de Anquirina, que es una familia de proteínas que media en la

enlace de proteínas de membrana integrales con el citoesqueleto. Una única repetición de anquirina es un motivo de 33 residuos que constituido por dos hélices α y un giro β . Pueden modificarse por ingeniería genética para enlazarse a diferentes antígenos diana mediante: selección aleatoria
5 de residuos en la primera hélice α y un giro β de cada repetición; o inserción de secuencias peptídicas, tales como una o más CDR. Su interfaz de enlace puede aumentarse aumentando el número de módulos (un procedimiento de maduración por afinidad). Para detalles adicionales véase
10 J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) y J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) y la Patente de los Estados Unidos Número US20040132028A1.

La fibronectina es un armazón que puede modificarse por ingeniería genética para enlazarse a antígeno. Las adnectinas consisten en una
15 cadena principal de la secuencia de aminoácidos natural del 10º dominio de las 15 unidades repetidas de fibronectina humana tipo III (FN3). Tres bucles en un extremo del sándwich β pueden modificarse por ingeniería genética para permitir que una Adnectina reconozca específicamente una
20 diana terapéutica de interés. Para detalles adicionales véase Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005), documentos US20080139791, WO2005056764 y US6818418B1.

Los aptámeros peptídicos son moléculas de reconocimiento combinatorias que consisten en una proteína de armazón constante,
25 típicamente tiorredoxina (TrxA) que contiene un bucle peptídico variable

limitado insertado en el sitio activo. Para detalles adicionales véase Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005).

Los microcuerpos derivan de microproteínas de origen natural de 25-50 aminoácidos de longitud que contienen 3-4 puentes de cisteína; los
5 ejemplos de microproteínas incluyen KalataB1 y conotoxina y knotinas. Las microproteínas tienen un bucle que puede modificarse por ingeniería genética para incluir hasta 25 aminoácidos sin afectar al pliegue global de la microproteína. Para detalles adicionales de dominios de knotina
10 modificados por ingeniería genética, véase el documento WO2008098796.

Otros dominios de enlace incluyen proteínas que se han usado como un armazón para modificar por ingeniería genética diferentes propiedades de enlace a antígeno diana que incluyen γ -cristalina humana y ubiquitina humana (afilinas), dominios tipo kunitz de los inhibidores de proteasa
15 humana, dominios PDZ de la proteína de enlace a Ras AF-6, toxinas de escorpión (caribdotoxina), dominio de lectina tipo C (tetranequinas) se revisan en el Capítulo 7- Non-Antibody Scaffolds de Handbook of Therapeutic Antibodies (2007, editado por Stefan Dubel) y Protein Science
20 15: 14-27 (2006). Los dominios de enlace de la presente invención pueden derivar de cualquiera de estos dominios de proteínas alternativos y cualquier combinación de las CDR de la presente invención insertadas en el dominio.

Un fragmento de enlace a antígeno o un fragmento
25 inmunológicamente eficaz puede comprender secuencias variables de

cadena pesada o ligera parciales. Los fragmentos tienen cuando menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos de longitud. Como alternativa los fragmentos tienen cuando menos 15, cuando menos 20, cuando menos 50, cuando menos 75 o cuando menos 100 aminoácidos de longitud.

5 La expresión "se enlaza específicamente" como se usa a lo largo de la presente memoria descriptiva en relación con las proteínas de enlace a antígeno significa que la proteína de enlace a antígeno se enlaza a CD127 sin enlace o con enlace insignificante a otras proteínas (por ejemplo, sin
10 relación). La expresión, sin embargo, no excluye el hecho de que las proteínas de enlace a antígeno también pueden reaccionar de forma cruzada con CD127 de otras especies, tales como CD127 murino, CD127 de mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*) o tití. En una modalidad, la proteína de enlace a antígeno se enlaza a CD127 tanto de mono cinomolgo
15 como de tití. Las propiedades de enlace a antígeno descritas en el presente documento pueden enlazarse a CD127 humano con una afinidad cuando menos 2, 5, 10, 50, 100 ó 1000 veces mayor que con la que se enlazan a CD127 de otras especies.

20 La afinidad de enlace o la constante disociación en equilibrio (K_D) de la interacción de proteína de enlace a antígeno-CD127 puede ser de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 2 nM o menos o 1 nM o menos. Como alternativa la K_D puede estar entre 5 y 10 nM o entre 1 y 2 nM. La K_D puede estar entre 1 pM y 500 pM o entre 500 pM y 1 nM. La afinidad de enlace de
25 la proteína de enlace a antígeno se determina mediante la constante de

velocidad de asociación (k_a) y la constante de velocidad de disociación (k_d) ($K_D = k_d/k_a$). La afinidad de enlace puede medirse mediante BIAcore™, por ejemplo, mediante captura de antígeno con CD127 acoplado a una microplaca CM5 mediante acoplamiento de amina primaria y captura de anticuerpos en esta superficie. El procedimiento de BIAcore™ descrito en el Ejemplo 4 puede usarse para medir la afinidad de enlace. Como alternativa, la afinidad de enlace puede medirse mediante FORTEbio, por ejemplo, mediante captura de antígeno con CD127 acoplado en una aguja CM5 mediante acoplamiento de amina primaria y captura de anticuerpos en esta superficie.

La k_d puede ser $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, o $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ o menos. La k_d puede estar entre $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o entre $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Una k_d lenta puede dar como resultado una disociación lenta del complejo de proteína de enlace a antígeno-ligando y neutralización mejorada del ligando.

Resultará evidente para los expertos en la materia que se pretende que el término "derivado" defina no solamente la fuente en el sentido de ser el origen físico del material sino también que defina material que es estructuralmente idéntico al material pero que no se origina desde la fuente de referencia. De este modo los "residuos hallados en el anticuerpo donador" no tienen necesariamente que haberse purificado del anticuerpo donador.

Por aislado se entiende que la molécula, tal como una proteína de

enlace a antígeno, se retira del ambiente en el que puede encontrarse la naturaleza. Por ejemplo, la molécula puede separarse por purificación de sustancias con las que normalmente existiría en la naturaleza. Por ejemplo, la proteína de enlace a antígeno puede purificarse hasta el menos el 95 por
5 ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento o el 99 por ciento, o más con respecto a un medio de cultivo que contiene la proteína de enlace a antígeno. Las proteínas de enlace a antígeno y los anticuerpos de la presente invención pueden aislar las proteínas de enlace a antígeno y
10 los anticuerpos.

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un tipo de anticuerpo desarrollado por ingeniería genética que contiene una región variable de origen natural (cadena ligera y cadenas pesadas) derivado de un anticuerpo donador junto con regiones constantes de cadena ligera y
15 pesada derivadas de un anticuerpo aceptor.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo desarrollado por ingeniería genética que tiene una o más de sus CDR derivadas de una inmunoglobulina donadora no human, derivando el residuo de las partes derivadas de inmunoglobulina de la molécula de una
20 o más inmunoglobulinas humanas. Además, los residuos de soporte de armazón pueden alterarse para conservar la afinidad de enlace (véase, por ejemplo, Queen y colaboradores, Proc. Natl Acad Sci USA, 86: 10029-10032 (1989), Hodgson y colaboradores, Bio/Technology, 9: 421 (1991)).

25 Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede ser uno seleccionado de

una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos KABAT®, base de datos de Los Álamos, base de datos de Swiss Protein, por homología con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del anticuerpo donador. Un anticuerpo humano caracterizado por una

5 homología con las regiones de marco del anticuerpo donador (en una base de aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o un marco variable de cadena pesada para la inserción de las CDR donadoras. Un anticuerpo aceptor adecuado capaz

10 de donar regiones de marco variables o constantes de cadena ligera puede seleccionarse de una manera similar. Debería observarse que no se requiere que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor se originen del mismo anticuerpo aceptor. La técnica anterior describe varios modos para producir dichos anticuerpos humanizados, véase por ejemplo, los

15 documentos EP-A-0239400 y EP-A-054951.

La expresión “anticuerpo donador” se refiere a un anticuerpo que contribuye a las secuencias de aminoácidos de sus regiones variables, una o más CDR u otros fragmentos o análogos funcionales de los mismos a un

20 primer compañero de inmunoglobulina. El donador por lo tanto proporciona la región codificante de inmunoglobulina alterada y el anticuerpo alterado expresado resultante con la especificidad antigénica y actividad neutralizadora característica del anticuerpo donador.

La expresión “anticuerpo aceptor” se refiere a un anticuerpo que es

25 heterólogo del anticuerpo donador, que contribuye con todas (o cualquier

parte de) las secuencias de aminoácidos que codifican sus regiones de marco de cadena pesada y/o ligera y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera al primer compañero de inmunoglobulina. Un anticuerpo humano puede ser el anticuerpo aceptor.

5 Los términos " V_H " y " V_L " se usan en el presente documento para referirse a la región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera respectivamente de una proteína de enlace a antígeno. V_K también se usa para referirse al dominio de cadena ligera variable.

10 "CDR" se definen como las secuencias de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad de una proteína de enlace a antígeno. Estas son las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. Existen tres CDR (o regiones CDR) de cadena pesada y tres de cadena ligera en la parte variable de una inmunoglobulina.

15 De este modo, "CDR" como se usa en el presente documento se refiere a las tres CDR de cadena pesada, las tres CDR cadena ligera, todas las CDR de cadena pesada y ligera o cuando menos dos CDR.

A lo largo de esta memoria descriptiva, los residuos de aminoácidos en las secuencias de dominio variable y secuencias de anticuerpo de

20 longitud completa se numeran de acuerdo con la convención de numeración de Kabat, a no ser que se especifique de otro modo. De forma similar, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" usados en los Ejemplos sigue la convención de

25 numeración de Kabat. Para información adicional, véase Kabat y

colaboradores, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª Edición, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987).

5 Resultará evidente para los expertos en la materia que existen convenciones de numeración alternativas para residuos de aminoácidos en secuencias de dominio variable y secuencias de anticuerpos de longitud completa. Existen también convenciones de numeración alternativas para secuencias CDR, por ejemplo, las expuestas en Chothia y colaboradores (1989) Nature 342: 877-883. La estructura y plegamiento proteico del anticuerpo puede implicar que otros residuos se consideren parte de la secuencia CDR y se entendería que es así por un experto. Por lo tanto, la expresión "CDR correspondiente" se usa en el presente documento para referirse a una secuencia CDR que usa cualquier combinación de 10 numeración, por ejemplo, las expuestas en la Tabla 1.

Otras convenciones de numeración para secuencias de CDR disponibles para un experto incluyen los procedimientos de "AbM" (Universidad de Bath) y de "contacto" (Escuela Universitaria de Londres). La región solapante mínima que usa cuando menos dos de los 20 procedimientos de Kabat, Chothia, AbM y contacto se puede determinar que proporciona la "unidad de enlace mínima". La unidad de enlace mínima puede ser una subparte de una CDR.

La Tabla 1 a continuación representa una definición que utiliza cada 25 convención de numeración para cada CDR o unidad de enlace. Se usa el

esquema de numeración de Kabat en la Tabla 1 para numerar la secuencia de aminoácidos de dominio variable. Debería observarse que algunas de las definiciones de CDR pueden variar dependiendo de la publicación individual usada.

5

TABLA 1:

10

15

20

	CDR Kabat	CDR Chothia	CDR AbM	CDR Contacto	Unidad de enlace mínima
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

25

Como se usa en el presente documento, el término “sitio de enlace a antígeno” se refiere a un sitio en una proteína de enlace a antígeno que es

capaz de enlazarse específicamente a un antígeno. Este puede ser un dominio sencillo (por ejemplo, un dominio de enlace a epítopo) o un dominio de Fv de cadena sencilla (ScFv) o pueden ser dominios emparejados V_H/V_L como se pueden encontrar en un anticuerpo convencional.

El término "epítopo" como se usa en el presente documento se refiere a la parte del antígeno que entra en contacto con un dominio de enlace particular de la proteína de enlace a antígeno. Un epítopo puede ser lineal, comprendiendo esencialmente una secuencia de aminoácidos lineal. Como alternativa, un epítopo puede ser conformacional o discontinuo. Por ejemplo, un epítopo conformacional comprende residuos de aminoácidos que requieren de un elemento de restricción estructural. Un epítopo discontinuo comprende residuos de aminoácidos que están separados por otras secuencias, es decir no en una secuencia continua en la secuencia primaria del antígeno. En el contexto de la estructura terciaria y cuaternaria del antígeno, los residuos de un epítopo discontinuo están lo suficientemente cerca entre sí para enlazarse mediante una proteína de enlace a antígeno.

Para las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, la expresión "idéntico" o "identidad de secuencia" indica el grado de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o dos secuencias de aminoácidos y, si se requiere, cuando se alinean de forma óptima y en comparación con inserciones o supresiones apropiadas.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, por ciento de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones por 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación de porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático, como se describe posteriormente.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de pesos de residuos PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

En un método, una secuencia polinucleotídica puede ser idéntica a una secuencia polinucleotídica de referencia como se describe en el presente documento (véase por ejemplo, SEQ ID N°: 30-39, SEQ ID N°: 76-105) que es idéntica al 100 por ciento o puede incluir hasta un cierto
5 número entero de alteraciones de nucleótidos en comparación con la secuencia de referencia, tal como cuando menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 ó 99 por ciento idénticas. Dichas alteraciones se seleccionan de supresión, sustitución, incluyendo transición y transversión, o inserción de
10 cuando menos un nucleótido y pudiendo producirse dichas alteraciones en las posiciones 5' ó 3' terminal de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier punto entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El
15 número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en la secuencia polinucleotídica de referencia como se describe en el presente documento (véase por ejemplo, SEQ ID N°: 30-39, SEQ ID N°: 76-105), por el porcentaje numérico del porcentaje de identidad respectivo (dividido por 100) y restando ese producto de dicho
20 número total de nucleótidos en la secuencia polinucleotídica de referencia como se describe en el presente documento (véase por ejemplo, SEQ ID N°: 30-39, SEQ ID N°: 76-105), o:

25

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y),$$

en la que n_n es el número de alteraciones de nucleótidos, x_n es el número total de nucleótidos en la secuencia polinucleotídica de referencia como se describe en el presente documento (véase por ejemplo, SEQ ID N°: 30-39, SEQ ID N°: 76-105) e y es 0.50 para el 50 por ciento, 0.60 para el 60 por ciento, 0.70 para el 70 por ciento, 0.75 para el 75 por ciento, 0.80 para el 80 por ciento, 0.85 para el 85 por ciento, 0.90 para el 90 por ciento, 0.95 para el 95 por ciento, 0.98 para el 98 por ciento, 0.99 para el 99 por ciento o 1,00 para el 100 por ciento, $\bullet$ es el símbolo para el operador de multiplicación y en la que cualquier producto no entero de x_n e y se redondea hacia abajo al entero más cercano antes de restarlo de x_n .

De forma similar una secuencia polipeptídica puede ser idéntica a una secuencia de referencia polipeptídica como se describe en el presente documento (véase por ejemplo, SEQ ID N°: 1-29, SEQ ID N°: 40-75) que es idéntica al 100 por ciento o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia de modo que el porcentaje de identidad es menor del 100 por ciento, tal como cuando menos 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 ó 99 por ciento idéntica. Dichas alteraciones se seleccionan del grupo que constituido por supresión, sustitución, incluyendo sustitución conservativa y no conservativa, o inserción de cuando menos un aminoácido y pudiendo producirse dichas alteraciones en las posiciones amino o carboxi terminal de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier punto entre esas

posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de aminoácidos para un porcentaje de identidad dado se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia de referencia polipeptídica como se describe en el presente documento (véase por ejemplo, SEQ ID N°: 1-29, SEQ ID N°: 40-75) por el porcentaje numérico del porcentaje de identidad respectivo (dividido por 100) y restando después ese producto de dicho número total de aminoácidos en la secuencia de referencia polipeptídica como se describe en el presente documento (véase por ejemplo, SEQ ID N°: 1-29, SEQ ID N°: 40-75), o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y),$$

en la que n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia como se describe en el presente documento (véase por ejemplo, SEQ ID N°: 1-29, SEQ ID N°: 40-75) e y es 0.50 para el 50 por ciento, 0.60 para el 60 por ciento, 0.70 para el 70 por ciento, 0.75 para el 75 por ciento, 0.80 para el 80 por ciento, 0.85 para el 85 por ciento, 0.90 para el 90 por ciento, 0.95 para el 95 por ciento, 0.98 para el 98 por ciento, 0.99 para el 99 por ciento o 1,00 para el 100 por ciento, $\bullet$ es el símbolo para el operador de multiplicación y en la que cualquier producto no entero de x_a e y se

redondea hacia abajo al entero más cercano antes de restarlo de x_a .

El por ciento de identidad puede determinarse a lo largo de la longitud completa de la secuencia, o cualquier fragmento de la misma; y con o sin cualquier inserción o supresión.

5 Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se refiere cada uno a una molécula que comprende dos o más residuos de aminoácidos. Un péptido puede ser monomérico o polimérico.

10 Se reconoce bien en la técnica que ciertas sustituciones de aminoácidos se consideran “conservativas”. Los aminoácidos se dividen en grupos basándose en propiedades de cadenas laterales comunes y las sustituciones dentro de grupos que mantienen toda o sustancialmente toda la afinidad de enlace de la proteína de enlace a antígeno se consideran sustituciones conservativas, véase la Tabla 2 a continuación:

15 **TABLA 2**

Cadena lateral	Miembros
Hidrófoba	met, ala, val, leu, ile
Hidrófila neutra	cys, ser, thr
Ácida	asp, glu
Básica	asn, gln, his, lys, arg
25 Residuos que afectan a la	gly, pro

orientación de cadena	
Aromática	trp, tyr, phe

5 La presente invención proporciona una proteína de enlace a
antígeno que se enlaza a CD127 y comprende CDRH3 de SEQ ID N°: 4;
una variante de CDRH3 de la misma o una CDRH3 de SEQ ID N°: 132 a
SEQ ID N°: 137. La proteína de enlace a antígeno a CD127 puede ser
10 específica y también puede neutralizar la actividad de IL-7R.

 La presente invención también proporciona una proteína de enlace a
antígeno que se enlaza a CD127 y comprende CDRH2 de SEQ ID N°: 3; o
una variante de CDRH2 de la misma. La proteína de enlace a antígeno a
CD127 también puede neutralizar la actividad de IL-7R.

15 La proteína de enlace a antígeno puede comprender adicionalmente
además de las secuencias de CDRH3 o CDRH2 descritas anteriormente,
una o más CDR, o todas las CDR, en cualquier combinación,
seleccionadas de: CDRH1 (SEQ ID N°: 2), CDRH2 (SEQ ID N°: 3), CDRH3
(SEQ ID N°: 4, o cualquiera de SEQ ID N°: 132 a SEQ ID N°: 137), CDRL1
20 (SEQ ID N°: 5), CDRL2 (SEQ ID N°: 6) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7); o una
variante de cualquiera de dichas CDR.

 Por ejemplo, la proteína de enlace a antígeno puede comprender
CDRH3 (SEQ ID N°: 4) y CDRH1 (SEQ ID N°: 2), o variantes de las
25 mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH3

(SEQ ID N°: 4) y CDRH2 (SEQ ID N°: 3) o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH1 (SEQ ID N°: 2) y CDRH2 (SEQ ID N°: 3) y CDRH3 (SEQ ID N°: 4) o variantes de las mismas.

5

La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRL1 (SEQ ID N°: 5) y CDRL2 (SEQ ID N°: 6), o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRL2 (SEQ ID N°: 6) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7), o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRL1 (SEQ ID N°: 5), CDRL2 (SEQ ID N°: 6) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7), o variantes de las mismas.

10

La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID N°: 4) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7), o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID N°: 4), CDRH2 (SEQ ID N°: 3) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7), o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID N°: 4), CDRH2 (SEQ ID N°: 3), CDRL2 (SEQ ID N°: 6) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7), o variantes de las mismas.

15

20

La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH1 (SEQ ID N°: 2), CDRH2 (SEQ ID N°: 3), CDRH3 (SEQ ID N°: 4), CDRL1 (SEQ ID N°: 5), CDRL2 (SEQ ID N°: 6) y CDRL3 (SEQ ID N°: 7). Como alternativa, pueden estar presentes variantes de CDR, o el CDRH3 de la SEQ ID N°: 4 se pueden remplazar con cualquiera de los CDR de la SEQ ID N°: 132-137.

25

La presente invención proporciona una proteína de enlace a

antígeno que se enlaza a CD127 y comprende CDRH3 de SEQ ID N°: 41 o una variante de CDRH3 de la misma. La proteína de enlace a antígeno puede también neutralizar la actividad de IL-7R.

5 La presente invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que se enlaza a CD127 y comprende CDRH2 de SEQ ID N°: 41 o una variante de CDRH2 de la misma. La proteína de enlace a antígeno también puede neutralizar la actividad de IL-7R.

10 La proteína de enlace a antígeno puede comprender adicionalmente además de las secuencias de CDRH3 o CDRH2 descritas anteriormente, una o más CDR, o todas las CDR, en cualquier combinación, seleccionadas de: CDRH1 (SEQ ID N°: 39), CDRH2 (SEQ ID N°: 40), CDRH3 (SEQ ID N°: 41), CDRL1 (SEQ ID N°: 42), CDRL2 (SEQ ID N°: 43) y CDRL3 (SEQ ID N°: 44) o una variante de cualquiera de dichas CDR.

15 Por ejemplo, la proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID N°: 41) y CDRH1 (SEQ ID N°: 40), o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID N°: 41) y CDRH2 (SEQ ID N°: 40), o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH1 (SEQ ID N°: 39)
20 y CDRH2 (SEQ ID N°: 40), y CDRH3 (SEQ ID N°: 41), o variantes de las mismas.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRL1 (SEQ ID N°: 42) y CDRL2 (SEQ ID N°: 43), o variantes de las mismas. La
25 proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRL2 (SEQ ID N°: 43)

y CDRL3 (SEQ ID N°: 44), o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRL1 (SEQ ID N°: 42), CDRL2 (SEQ ID N°: 43) y CDRL3 (SEQ ID N°: 44), o variantes de las mismas.

5 La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID N°: 41) y CDRL3 (SEQ ID N°: 44), o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID N°: 41), CDRH2 (SEQ ID N°: 40) y CDRL3 (SEQ ID N°: 44), o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH3 (SEQ ID N°: 41), CDRH2 (SEQ ID N°: 40), CDRL2 (SEQ ID N°: 43) y
10 CDRL3 (SEQ ID N°: 44), o variantes de las mismas.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender CDRH1 (SEQ ID N°: 39), CDRH2 (SEQ ID N°: 40), CDRH3 (SEQ ID N°: 41), CDRL1 (SEQ ID N°: 42), CDRL2 (SEQ ID N°: 43) y CDRL3 (SEQ ID N°: 44). Como
15 alternativa, puede estar presente variantes de CDR.

La presente invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que se enlaza a CD127 y comprende la CDRH3 correspondiente de la secuencia de dominio variable de SEQ ID N°: 8, o una variante de CDRH3 de la misma, en un armazón aceptor humano. La proteína de
20 enlace a antígeno puede neutralizar la actividad de CD127. La proteína de enlace a antígeno puede ser un anticuerpo humano, quimérico o humanizado.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender adicionalmente
25 una o más, o todas las CDR correspondientes seleccionadas de la

secuencia de dominio variable de SEQ ID N°: 8 y/o SEQ ID N°: 9 o una variante de CDR de las mismas.

La presente invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que se enlaza a CD127 y comprende la CDRH3 correspondiente de la secuencia de dominio variable de SEQ ID N°: 45, o una variante de CDRH3 de la misma, en un armazón aceptor humano. La proteína de enlace a antígeno puede neutralizar la actividad de CD127. La proteína de enlace a antígeno puede ser un anticuerpo humano, quimérico o humanizado.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender adicionalmente una o más, o todas las CDR correspondientes seleccionadas de la secuencia de dominio variable de SEQ ID N°: 45 y/o SEQ ID N°: 46, o una variante de CDR de las mismas.

Por ejemplo, la proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRH3 correspondiente y la CDRH1 correspondiente, o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRH3 correspondiente y la CDRH2 correspondiente, o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRH1 correspondiente, la CDRH2 correspondiente y la CDRH3 correspondiente, o variantes de las mismas.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRL1 correspondiente y la CDRL2 correspondiente o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRL2

correspondiente o la CDRL3 correspondiente o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRL1 correspondiente, la CDRL2 correspondiente y la CDRL3 correspondiente, o variantes de las mismas.

5

La proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRH3 correspondiente y la CDRL3 correspondiente, o variantes de las mismas.

10

La proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRH3 correspondiente, la CDRH2 correspondiente y la CDRL3 correspondiente, o variantes de las mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRH3 correspondiente, la CDRH2 correspondiente, la CDRL2 correspondiente y la CDRL3 correspondiente, o variantes de las mismas.

15

La proteína de enlace a antígeno puede comprender la CDRH1 correspondiente, la CDRH2 correspondiente, la CDRH3 correspondiente, la CDRL1 correspondiente, la CDRL2 correspondiente y la CDRL3 correspondiente, o variantes de las mismas.

20

La CDR correspondiente puede definirse por referencia a los procedimientos de Kabat (1987), Chothia (1989), AbM o de contacto. Una definición de cada uno de los métodos puede encontrarse en la Tabla 1 y puede aplicarse al dominio variable de cadena pesada de referencia (SEQ ID N°: 8 o SEQ ID N°: 45) y el dominio variable de cadena ligera de referencia (SEQ ID N°: 9 y SEQ ID N°: 46) para determinar la CDR

25

correspondiente.

La presente invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que se enlaza a CD127 y comprende una unidad de enlace H3 que comprende los residuos de Kabat 95-101 de SEQ ID N°: 8 o una variante de H3. La proteína de enlace a antígeno puede ser una proteína de enlace a antígeno humana, humanizada o quimérica, tal como un anticuerpo.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender adicionalmente una o más o todas las unidades de enlace seleccionadas de: H1 que comprende los residuos de Kabat 31-32 de SEQ ID N°: 8, H2 que comprende los residuos de Kabat 52-56 de SEQ ID N°: 8, L1 que comprende los residuos de Kabat 30-34 de SEQ ID N°: 9, L2 que comprende los residuos de Kabat 50-55 de SEQ ID N°: 9 y L3 que comprende los residuos de Kabat 89-96 de SEQ ID N°: 9; o una variante de unidad de enlace.

La presente invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que se enlaza a CD127, y comprende una unidad de enlace H3 que comprende los residuos de Kabat 95-101 de SEQ ID N°: 45, o una variante de H3. La proteína de enlace a antígeno puede ser una proteína de enlace a antígeno humana, humanizada o quimérica, tal como un anticuerpo.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender adicionalmente una o más, o todas las unidades de enlace seleccionadas de: H1 que comprende los residuos de Kabat 31-32 de SEQ ID N°: 45, H2 que

comprende los residuos de Kabat 52-56 de SEQ ID N°: 46, L1 que
comprende los residuos de Kabat 30-34 de SEQ ID N°: 46, L2 que
comprende los residuos de Kabat 50-55 de SEQ ID N°: 46 y L3 que
comprende los residuos de Kabat 89-96 de SEQ ID N°: 46; o una unidad de
5 enlace variante.

Por ejemplo, la proteína de enlace a antígeno puede comprender
una unidad de enlace H3 y una unidad de enlace H1, o variantes de las
mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender una unidad
de enlace H3 y una unidad de enlace H2, o variantes de las mismas. La
10 proteína de enlace a antígeno puede comprender una unidad de enlace H1,
una unidad de enlace H2 y una unidad de enlace H3, o variantes de las
mismas.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender una unidad de
15 enlace L1 y una unidad de enlace L2, o variantes de las mismas. La
proteína de enlace a antígeno puede comprender una unidad de enlace L2
y una unidad de enlace L3, o variantes de las mismas. La proteína de
enlace a antígeno puede comprender una unidad de enlace L1, una unidad
de enlace L2 y una unidad de enlace L3, o variantes de las mismas.

20 La proteína de enlace a antígeno puede comprender una unidad de
enlace H3 y una unidad de enlace L3, o variantes de las mismas. La
proteína de enlace a antígeno puede comprender una unidad de enlace H3,
una unidad de enlace H2 y una unidad de enlace L3; o variantes de las
25 mismas. La proteína de enlace a antígeno puede comprender una unidad

de enlace H3, una unidad de enlace H2, una unidad de enlace L2 y una unidad de enlace L3; o variantes de las mismas.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender una unidad de enlace H1, una unidad de enlace H2, una unidad de enlace H3, una unidad
5 de enlace L1, una unidad de enlace L2 y una unidad de enlace L3, o variantes de las mismas.

Una variante de CDR o unidad de enlace variante incluye una secuencia de aminoácidos modificada en cuando menos un aminoácido, pudiendo ser dicha modificación química o una alteración parcial de la
10 secuencia de aminoácidos (por ejemplo, en no más de 10 aminoácidos), permitiendo dicha modificación que la variante conserve las características biológicas de la secuencia no modificada. Por ejemplo, la variante es una variante funcional que se enlaza a CD127. Una alteración parcial de la
15 secuencia de aminoácidos de CDR puede ser mediante supresión o sustitución de uno a varios aminoácidos o por adición o inserción de uno o varios aminoácidos, o por una combinación de las mismas (por ejemplo, en no más de 10 aminoácidos). La CDR variante o variante de unidad de
20 enlace puede contener 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos, en cualquier combinación, en la secuencia de aminoácidos. La variante de CDR o variante de unidad de enlace puede contener 1, 2 ó 3 sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos, en cualquier combinación, en la secuencia de aminoácidos. Las
25 sustituciones en los residuos de aminoácidos pueden ser sustituciones

conservativas, por ejemplo, que sustituyen un aminoácido hidrófobo con un aminoácido hidrófobo alternativo. Por ejemplo, la leucina puede sustituirse con valina o isoleucina.

5 Las CDR L1, L2, L3, H1, H2 y H3 tienden a mostrar estructuralmente una de un número finito de conformaciones de cadena principal (canónicas). La clase de estructura canónica particular de una CDR se define por la longitud de la CDR y el empaquetamiento del bucle, determinados por los residuos localizados en posiciones claves en las CDR y las regiones de marco (residuos estructuralmente determinantes o SDR).
10 Martin y Thornton (1996; J Mol Biol 263: 800-815) ha generado un procedimiento automático para definir las plantillas canónicas de "residuo clave". Se usa análisis de grupo para definir las clases canónicas de conjuntos de CDR y las plantillas canónicas se identifican después
15 mediante el análisis de residuos hidrófobos internados enlazados con hidrógeno y glicinas y prolinas conservadas. Las CDR de las secuencias de anticuerpos pueden asignarse a clases canónicas por comparación de las secuencias con las plantillas de residuo clave y puntuando cada plantilla usando matrices de identidad o similitud.

20 Basándose en la clase canónica del anticuerpo 1A11 H3L4 (SEQ ID N°: 13 (1A11.H3 V_H) o SEQ ID N°: 22 (1A11.L4 V_K)), puede predecirse que la enlace de anticuerpo funcional se mantendría en presencia de las siguientes sustituciones de CDR, en las que el aminoácido antes del
25 número de Kabat es la secuencia de aminoácidos original y la secuencia de

aminoácidos al final del número de Kabat es el aminoácido sustituido:

Sustituciones de CDRH1:

- Y32I, Y32H, Y32F, Y32T, Y32N, Y32C, Y32E, Y32D
- T33Y, T33A, T33W, T33G, T33L, T33V
- 5 M34I, M34V, M34W
- N35E, N35H, N35Q, N35S, N35Y, N35T

Sustituciones de CDRH2:

- L50R, L50E, L50W, L50Y, L50G, L50Q, L50V, L50N, L50K, N50A
- 10 I51L, I51V, I51T, I51S, I51N
- N52D, N52L, N52S, N52Y
- Y53A, Y53G, Y53S, Y53K, Y53T, Y53N
- N54S, N54T, N54K, N54D, N54G
- V56Y, V56R, V56E, V56D, V56G, V56S, V56A
- 15 S58K, S58N, S58T, S58D, S58R, S58G, S58F, S58Y

Sustituciones de CDRH3:

- V102Y, V102H, V102I, V102S, V102D, V102G

Sustituciones de CDRL1:

- 20 S29V
- M33L

Sustituciones de CDRL3:

- Q89L
- E90Q
- 25 W91Y

Y93S, Y93R

De este modo, la proteína de enlace a antígeno puede tener o no cualquiera de las sustituciones anteriores dentro de las posiciones de CDR. Pueden existir múltiples sustituciones por variante de CDR, por CDR correspondiente, por unidad de enlace, por región variable de cadena pesada o ligera, por cadena pesada o ligera y por proteína de enlace a antígeno y por lo tanto puede estar presente cualquier combinación de sustituciones en la proteína de enlace a antígeno de la invención, siempre que la estructura canónica de la CDR se mantenga.

Para evitar dudas, las sustituciones anteriormente descritas no deberían interpretarse como limitantes de las posibles sustituciones de CDR que pueden realizarse manteniendo aún un anticuerpo funcional anti-CD127.

La proteína de enlace a antígeno que comprende las CDR, CDR correspondientes, variantes de CDR, unidades de enlace o variantes de unidades de enlace descritas, pueden presentar una potencia para la enlace a CD127, como se demuestra mediante CE50, dentro de 10 veces, o dentro de 5 veces la potencia demostrada por 1A11c (quimera, V_H – SEQ ID N°: 28, V_K – SEQ ID N°: 29) o 6A3c (quimera, V_H – SEQ ID N°: 74, V_K – SEQ ID N°: 75). La potencia para la enlace a CD127 puede demostrarse por diversos procedimientos, tales como afinidad de enlace (por ejemplo, mediante BIAcore) o CE50 (por ejemplo, mediante un ensayo de ELISA).

Como se ha analizado anteriormente, la clase de estructura canónica

particular de una CDR se define por la longitud de la CDR y por el empaquetamiento de bucle, determinados por los residuos localizados en posiciones clave en las CDR y las regiones de marco conservados. Por lo tanto además de las CDR enumeradas en SEQ ID N°: 2-6, variantes de CDR, CDR correspondientes, unidades de enlace o variantes de las mismas, pueden realizarse sustituciones en los residuos de marco de una proteína de enlace a antígeno de la invención, basándose en la clase canónica, manteniendo aún un anticuerpo funcional. Estas pueden incluir (usando numeración de Kabat):

Cadena pesada: V, I o G en la posición 2; L o V en la posición 4; L, I, M o V en la posición 20; C en la posición 22; T, A, V, G o S en la posición 24; G en la posición 26; I, F, L o S en la posición 29; W en la posición 36; W o Y en la posición 47; I, M, V o L en la posición 48; I, L, F, M o V en la posición 69; V, A, R o L en la posición 71; A, L, V, Y o F en la posición 78; L o M en la posición 80; Y o F en la posición 90; C en la posición 92; y/o R, K, G, S, H o N en la posición 94; y/o

Cadena ligera: I, L o V en la posición 2; V, Q, L o E en la posición 3; M o L en la posición 4; C en la posición 23; W en la posición 35; Y, L o F en la posición 36; S, L, R o V en la posición 46; Y, H, F o K en la posición 49; Y o F en la posición 71; C en la posición 88; y/o F en la posición 98.

Una cualquiera, cualquier combinación, o todas las posiciones de marco descritas anteriormente pueden estar presentes en la proteína de enlace a antígeno de la invención. Pueden existir múltiples posiciones de

marco canónicas variantes por región variable de cadena pesada o ligera, por cadena pesada o ligera y por proteína de enlace a antígeno y por lo tanto puede estar presente cualquier combinación en la proteína de enlace a antígeno de la invención, siempre que la estructura canónica del armazón se mantenga.

Por ejemplo, el armazón variable de cadena pesada puede comprender V en la posición 2, L en la posición 4, V en la posición 20, C en la posición 22, A en la posición 24, G en la posición 26, F en la posición 29, W en la posición 36, W en la posición 47, M en la posición 48, L en la posición 69, R en la posición 71, A en la posición 78, M en la posición 80, Y en la posición 90, C en la posición 92 y R en la posición 94 y por ejemplo, el armazón variable de cadena ligera puede comprender I en la posición 2, L en la posición 4, C en la posición 23, W en la posición 35, Y en la posición 36, F en la posición 71, C en la posición 88, E en la posición 90 e Y en la posición 93.

Una o más de las CDR, CDR correspondientes, variantes de CDR o unidades de enlace descritas en el presente documento pueden estar presentes en el contexto de un armazón humano, por ejemplo, como un domino variable humanizado o quimérico.

El dominio variable de cadena pesada humanizado puede comprender las CDR numeradas en la SEQ ID N°: 2-4 o SEQ ID N°: 39-41; variantes de CDR de las mismas; CDR correspondientes; unidades de enlace; o variantes de las mismas, dentro de un armazón del anticuerpo

aceptor que tiene el 75 por ciento o más, el 80 por ciento o más, el 85 por ciento o más, el 90 por ciento o más, el 95 por ciento o más, el 98 por ciento o más, el 99 por ciento o más o el 100 por ciento de identidad en las regiones de marco con la secuencia de dominio variable de aceptor humano en la SEQ ID N°: 116.

El dominio variable de cadena ligera humanizado puede comprender las CDR numeradas en SEQ ID N°: 5-7 o SEQ ID N°: 42-44; variantes de CDR de las mismas; CDR correspondientes; unidades de enlace; o variantes de las mismas, dentro de un armazón del anticuerpo aceptor que tiene el 75 por ciento o más, el 80 por ciento o más, el 85 por ciento o más, el 90 por ciento o más, el 95 por ciento o más, el 98 por ciento o más, el 99 por ciento o más o el 100 por ciento de identidad en las regiones de marco con la secuencia de dominio variable de aceptor humano en la SEQ ID N°: 117.

La invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que se enlaza a CD127 y comprende una región variable de cadena pesada seleccionada de una cualquiera de SEQ ID N°: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 121, 123, 125, 127, 129 y 131. La proteína de enlace a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera seleccionada de una cualquiera de SEQ ID N°: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ó 27. Cualquiera de las regiones variables de cadena pesada puede combinarse con cualquiera de las regiones variables de cadena ligera. La proteína de enlace a antígeno también puede neutralizar CD127.

La invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que se enlaza a CD127 y comprende una región variable de cadena pesada seleccionada de una cualquiera de SEQ ID N°: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 ó 69. La proteína de enlace a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera seleccionada de una cualquiera de SEQ ID N°: 70, 71, 72, 73 ó 138. Cualquiera de las regiones variables de cadena pesada puede combinarse con cualquiera de las regiones variables de cadena ligera. La proteína de enlace a antígeno también puede neutralizar CD127.

La región variable de cadena pesada del anticuerpo puede tener el 75 por ciento o más, el 80 por ciento o más, el 85 por ciento o más, el 90 por ciento o más, el 95 por ciento o más, el 98 por ciento o más, el 99 por ciento o más o el 100 por ciento de identidad con una cualquiera de las SEQ ID N°: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 121, 123, 125, 127, 129, ó 131; o SEQ ID N°: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 ó 69.

La región variable de cadena ligera del anticuerpo puede tener el 75 por ciento o más, el 80 por ciento o más, el 85 por ciento o más, el 90 por ciento o más, el 95 por ciento o más, el 98 por ciento o más, el 99 por ciento o más o el 100 por ciento de identidad con una cualquiera de las SEQ ID N°: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ó 27; o SEQ ID N°: 70, 71, 72, 73 ó 138.

El porcentaje de identidad de las variantes de SEQ ID N°: 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 121, 123, 125, 127, 129, ó 131 puede determinarse a lo largo de la longitud completa de la secuencia.

5 La región variable de cadena pesada del anticuerpo puede ser una variante de una cualquiera de SEQ ID N°: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 121, 123, 125, 127, 129, ó 131 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos.

10 La región variable en cadena ligera del anticuerpo puede ser una variante de una cualquiera de SEQ ID N°: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ó 27 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos.

15 Por ejemplo, las CDR canónicas y las sustituciones de residuos de marco canónicas descritas anteriormente también pueden estar presentes en las variantes de regiones variables de cadena pesada o ligera como secuencias variantes que son cuando menos el 75 por ciento idénticas o que contienen hasta 30 sustituciones de aminoácidos.

20 En otra modalidad, la región variable de cadena pesada del anticuerpo puede ser una variante de una cualquiera de SEQ ID N°: 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68 ó 69 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. La región variable de cadena ligera del anticuerpo puede ser una variante de una cualquiera de SEQ ID
25 N°: 70, 71, 72 ó 73 que contiene 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1

sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos.

Por ejemplo, las CDR canónicas y las sustituciones de residuos de marco canónicas descritas anteriormente también pueden estar presentes en las variantes de regiones variables de cadena pesada o ligera como
5 secuencias variantes que son cuando menos el 75 por ciento idénticas o que contienen hasta 30 sustituciones de aminoácidos.

Cualquiera de las regiones variables de cadena pesada de la invención puede combinarse con una región constante humana adecuada.
10 Cualquiera de las regiones variables de cadena ligera de la invención puede combinarse con una región constante adecuada.

La invención también proporciona una proteína de enlace a antígeno que se enlaza a CD127 y comprende cualquiera de las siguientes combinaciones de dominio variable de cadena pesada y cadena ligera:
15 1A11.H3.L4 (SEQ ID N°: 13 y SEQ ID N°: 22) o una proteína de enlace a antígeno que tiene un dominio variable de cadena pesada que tiene cuando menos el 75 por ciento de identidad con SEQ ID N°: 13 y un dominio variable de cadena ligera que tiene cuando menos el 75 por ciento de
20 identidad con SEQ ID N°: 22. La proteína de enlace a antígeno también puede neutralizar CD127.

Las proteínas de enlace a antígeno como se han descrito anteriormente, por ejemplo, variantes con una alteración parcial de la secuencia por modificación química y/o inserción, supresión o sustitución
25 de uno o más residuos de aminoácidos, o las que tienen el 75 por ciento o

más, el 80 por ciento o más, el 85 por ciento o más, el 90 por ciento o más, el 95 por ciento o más, el 98 por ciento o más o el 99 por ciento o más identidad con cualquiera de las secuencias descritas anteriormente, puede presentar una potencia de enlace a CD127, como se demuestra mediante
5 CE50 o BIAcore, dentro de 10 veces o dentro de 5 veces la potencia demostrada por 1A11 o 6A3. La potencia de enlace con CD127, puede demostrarse por CE50, llevarse a cabo mediante un ensayo ELISA o, por afinidad de enlace, llevarse a cabo mediante BIAcore.

10 Los presentes inventores también han determinado experimentalmente que ciertas posiciones dentro de CDRH3 pueden sustituirse dando como resultado una afinidad de enlace reducida (es decir, enlace más fuerte). Dichos análogos de CDRH3 se exponen en la Tabla 4. Se vio que las sustituciones en las posiciones N98 y F100b (numeración de
15 Kabat) eran particularmente eficaces en el aumento de afinidad. Las sustituciones particulares incluyen N98D, N98E, F100bE, F100bI y F100bV. Las secuencias de CDRH3 que representan estas sustituciones son SEQ ID N°: 132, 133, 134, 135, 136, y 137, respectivamente.

20 La presente invención contempla la incorporación de dichas sustituciones en cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento.

25 En una modalidad, el anticuerpo de la invención comprende retención de W (Trp) en la posición 100.

Puede ser deseable modificar la función efectora del fragmento de enlace a antígeno, por ejemplo, para potenciar ADCC o CDC, semivida, etc.

5 En una modalidad, las proteínas de enlace a antígeno de la invención pueden tener Fc inactivado. Una forma de conseguir la inactivación de Fc comprende las sustituciones de los residuos de alanina en las posiciones 235 y 237 (numeración del índice de UE) de la región constante de cadena pesada. Como alternativa, la proteína de enlace a antígeno puede tener Fc activado y no comprender las sustituciones de alanina en las posiciones 235 y 237.

10 La proteína de enlace a antígeno puede tener una semivida de cuando menos 6 horas, cuando menos 1 día,, cuando menos 2 días, cuando menos 3 días, cuando menos 4 días, cuando menos 5 días, cuando menos 7 días o cuando menos 9 días *in vivo* en seres humanos o en un modelo animal murino.

20 La proteína de enlace a antígeno puede derivar de rata, ratón, primate (por ejemplo, cinomolgo, mono del Viejo Mundo o Gran Simio) o ser humano. La proteína de enlace a antígeno puede ser un anticuerpo humano, humanizado o quimérico. La proteína de enlace a antígeno puede comprender una región constante, que puede ser de cualquier isótopo o subclase. La región constante puede ser del isótopo de IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o variantes de los mismos. La región constante de la proteína de enlace a antígeno puede ser IgG1.

Pueden usarse cambios mutacionales de la parte efectora de Fc del anticuerpo para cambiar la afinidad de la interacción entre FcRn y el anticuerpo para modular la renovación de anticuerpo. La semivida del anticuerpo puede prolongarse *in vivo*. Esto podría ser beneficioso para poblaciones de pacientes puesto que podrían conseguirse cantidades de dosis máxima y frecuencias de dosificación máximas como resultado de mantener la CI50 *in vivo* durante periodos de tiempo más largos. La función efectora de Fc del anticuerpo puede eliminarse, en su totalidad o en parte, puesto que puede no ser deseable matar estas células que expresan CD127. Esta eliminación puede dar como resultado un perfil de seguridad aumentado.

La proteína de enlace a antígeno que comprende una región constante puede tener ADCC reducida y/o activación de complemento o funcionalidad efectora. El dominio constante puede comprender una región constante inactivada de forma natural del isotipo IgG2 o IgG4 o un dominio constante de IgG1 mutado. Se describen ejemplos de modificaciones adecuadas en el documento EP0307434. Una forma de conseguir la inactivación de Fc comprende las sustituciones de residuos de alanina en las posiciones 235 y 237 (numeración de índice de UE) de la región constante de cadena pesada.

La proteína de enlace a antígeno puede comprender una o más modificaciones seleccionadas de un dominio constante mutado de modo que el anticuerpo tiene funciones efectoras/ ADCC y/o activación de

complemento mejorados. Se describen ejemplos de modificaciones adecuadas en Shields y colaboradores, J. Biol. Chem (2001) 276: 6591-6604, Lazar y colaboradores, PNAS (2006) 103: 4005-4010 y los documentos US6737056, WO2004063351 y WO2004029207.

5 La proteína de enlace a antígeno puede comprender un domino constante con un perfil de glucosilación alterado de modo que la proteína de enlace a antígeno tiene funciones efectoras/ ADCC y/o activación de complemento potenciados. Se describen ejemplos de metodologías adecuadas para producir una proteína de un antígeno con un perfil de glucosilación alterado en los documentos WO2003/011878, 10 WO2006/014679 y EP1229125.

 El polipéptido CD127 al que se enlaza la proteína de enlace a antígeno puede ser un polipéptido recombinante y puede comprender el 15 dominio extracelular (ECD), opcionalmente fusionado con otra proteína, tal como un dominio Fc o puede comprender la proteína CD127 de longitud completa. CD127 puede estar en solución o estar unida a una superficie sólida. Por ejemplo, CD127 puede estar unida a perlas tales como perlas magnéticas. CD127 puede estar biotinilada. La molécula de biotina 20 conjugada con CD127 puede usarse para inmovilizar CD127 en una superficie sólida mediante el acoplamiento de biotina estreptavidina en la superficie sólida.

 La presente invención también proporciona una molécula de ácido 25 nucleico que codifica una proteína de enlace a antígeno como se describe

en el presente documento. La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia que codifica (i) una o más CDRH, la secuencia variable de cadena pesada o la secuencia de cadena pesada de longitud completa; y (ii) una o más CDRL, la secuencia variable de cadena ligera o la secuencia de cadena ligera de longitud completa, con (i) y (ii) en la misma molécula de ácido nucleico. Como alternativa, la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento puede comprender secuencias que codifican (a) una o más CDRH, la secuencia variable de cadena pesada o la secuencia de cadena pesada de longitud completa; o (b) una o más CDRL, la secuencia variable de cadena ligera o la secuencia de cadena ligera de longitud completa, con (a) y (b) en moléculas de ácido nucleico separadas.

La molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena pesada puede comprender SEQ ID N°: 30-36. La molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena ligera puede comprender SEQ ID N°: 10-113.

La molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena pesada puede comprender SEQ ID N°: 75-96. La molécula de ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena ligera puede comprender SEQ ID N°: 97-100.

La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico como se describe en el presente documento. También se proporciona una célula huésped

recombinante que comprende un vector de expresión como se describe en el presente documento.

La proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento puede producirse en una célula huésped adecuada. Un procedimiento para la producción de la proteína de enlace a antígeno como se describe en el presente documento puede comprender la etapa de cultivar una célula huésped como se describe en el presente documento y recuperar la proteína de enlace a antígeno. Una célula huésped recombinante transformada, transfectada o transducida puede comprender cuando menos un casete de expresión, por lo cual dicho casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento y comprende adicionalmente un polinucleótido que codifica una cadena ligera de la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento. Como alternativa, una célula huésped recombinante transformada, transfectada o transducida puede comprender cuando menos un casete de expresión, por lo cual un primer casete de expresión comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento y comprende adicionalmente un segundo casete que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera de la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento. Una célula huésped transformada de forma estable puede comprender un vector que comprende uno o más casetes de expresión que

codifican una cadena pesada y/o una cadena ligera de la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento. Por ejemplo, dichas células huésped pueden comprender un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica la cadena pesada.

5 La célula huésped puede ser eucariota, por ejemplo, de mamífero. Los ejemplos de dichas líneas celulares incluyen CHO o NS0. La célula huésped puede ser una célula huésped no humana. La célula huésped puede ser una célula huésped no embrionaria. La célula huésped puede cultivarse en un medio de cultivo, por ejemplo, un medio de cultivo sin suero. La proteína de enlace a antígeno puede ser secretada por la célula huésped hacia el medio de cultivo. La proteína de enlace a antígeno puede purificarse hasta cuando menos el 95 por ciento o más (por ejemplo, el 98 por ciento o más) con respecto a dicho medio de cultivo que contiene la

10

15 proteína de enlace a antígeno.

Una composición farmacéutica que comprende la proteína de enlace a antígeno y un vehículo farmacéuticamente aceptable también se proporciona mediante la presente invención. Un kit de partes que comprende la composición farmacéutica junto con instrucciones para su uso se proporciona adicionalmente. Por conveniencia, el kit de partes puede comprender los reactivos en las cantidades previamente determinadas con instrucciones para su uso.

20

Estructuras de Anticuerpos

25 Anticuerpos Intactos

Las cadenas ligeras de anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos llamados Kappa y Lambda, basándose en la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos pueden asignarse a cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA pueden subdividirse adicionalmente en las subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Existen variantes de especies teniendo ratón y rata cuando menos IgG2a, IgG2b.

Las partes más conservadas de la región variable se denominan como regiones de marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera intactas comprenden cada uno cuatro FR conectadas por tres CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en proximidad estrecha por las regiones FR y contribuyendo las CDR de la otra cadena a la formación del sitio de enlace a antígeno de los anticuerpos.

Las regiones constantes no están implicadas directamente en la enlace del anticuerpo al antígeno sino que muestran diversas funciones efectoras tales como participación en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediante enlace al receptor Fcγ, semivida/tasa de aclaramiento mediante el receptor de Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente del complemento mediante el componente C1q de la cascada de complementos.

Se ha publicado que la región constante de IgG2 humana carece

esencialmente de la capacidad para activar el complemento por la ruta clásica o para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Se ha publicado que la región constante de IgG4 carece de la capacidad para activar el complemento por la vía clásica y media en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo de forma débil solamente. Los anticuerpos que esencialmente carecen de esas funciones efectoras pueden denominarse anticuerpos “no líticos”. Puede ser deseable reducir la función efectora del anticuerpo de acuerdo con la invención, opcionalmente hasta el grado en el que el anticuerpo esencialmente no tenga función efectora. En una modalidad, el anticuerpo de acuerdo con la invención es no lítico. En una modalidad, el anticuerpo de acuerdo con la invención esencialmente no tiene función efectora. El anticuerpo puede, o no, estar conjugado con otra molécula, por ejemplo, una molécula dirigida a modificar la función efectora, tal como un residuo citotóxico o un residuo radiactivo. En una modalidad, el anticuerpo no está conjugado con otra molécula, tal como un radiomarcador o una molécula citotóxica. En esta modalidad, el anticuerpo consigue su efecto funcional bloqueando una interacción biológica natural, en lugar de hacerlo mediante un efecto de muerte celular directa.

Anticuerpos humanos

Pueden producirse anticuerpos humanos mediante varios procedimientos conocidos para los expertos en la materia. Pueden

prepararse anticuerpos humanos mediante el procedimiento del hibridoma usando líneas celulares de mieloma humano o de heteromieloma de ratón-humano véase Kozbor (1984) J. Immunol 133, 3001, y Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Los procedimientos alternativos incluyen el uso de bibliotecas de fagos o ratones transgénicos, en donde ambos utilizan repertorios de regiones variables humanas (véase Winter (1994) Annu. Rev. Immunol 12: 433-455; Green (1999) J. Immunol. Methods 231: 11-23).

Varias razas de ratones transgénicos están disponibles ahora en las que sus *loci* de inmunoglobulina de ratón se ha reemplazado con segmentos génicos de inmunoglobulina humana (véase Tomizuka (2000) PNAS 97: 722-727; Fishwild (1996) Nature Biotechnol. 14: 845-851; Mendez (1997) Nature Genetics, 15: 146-156). Tras la presentación de antígeno tales ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos de los que se pueden seleccionar anticuerpos de interés.

Puede usarse tecnología de presentación de fagos para producir proteínas de enlace a antígeno humanas (y fragmentos de las mismas), véase McCafferty (1990) Nature 348: 552-553 y Griffiths y col. (1994) EMBO 13: 3245-3260.

La técnica de maduración de afinidad (Marks Bio/technol (1992) 10: 779-783) puede usarse para mejorar la afinidad de enlace mejorándose la afinidad del anticuerpo humano primario por el reemplazo secuencial de las

regiones variables de cadena H y L con variantes de origen natural y seleccionando basándose en afinidades de enlace mejoradas. También están ahora disponibles variantes de esta técnica tales como "impronta de epítomos", véase por ejemplo, el documento WO 93/06213; Waterhouse
5 (1993) Nucl. Acids Res. 21: 2265-2266.

Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

Los anticuerpos quiméricos típicamente se producen usando procedimientos de ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos
10 (por ejemplo, ADNc) se aísla y secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplos mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de enlazarse específicamente a genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo. Las células de hibridoma sirven como una fuente típica de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se
15 sitúa en vectores de expresión que se transfectan después a células huésped tales como *E. coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que no producen de otro modo proteína inmunoglobulina para obtener síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse sustituyendo
20 con la secuencia codificante para las cadenas L y H las regiones constantes H y L no humanas correspondientes (por ejemplo, murinas), véase por ejemplo, Morrison (1984) PNAS 81: 6851.

Puede conseguirse una gran disminución en la inmunogenicidad mediante el injerto solamente de las CDR de anticuerpos no humanos (por
25 ejemplo, murinos) (anticuerpos "donadores") en armazón humano

("armazón aceptor") y las regiones constantes para generar anticuerpos humanizados (véase Jones y col. (1986) Nature 321: 522-525; y Verhoeven y col. (1988) Science 239: 1534-1536). Sin embargo, el injerto de CDR por sí mismo puede no dar como resultado la conservación completa de las propiedades de enlace a antígeno y se descubre con frecuencia que algunos residuos de marco (denominados a veces "retromutaciones") del anticuerpo donador necesitan conservarse en la molécula humanizada si se quiere recuperar afinidad de enlace a antígeno significativa (véase Queen y col. (1989) PNAS 86: 10.029-10.033; Co y col. (1991) Nature 351: 501-502). En este caso, las regiones variables humanas que muestran la mayor homología de secuencia con el anticuerpo donador no humano se seleccionan de una base de datos para proporcionar el marco conservado humano (FR). La selección de FR humanos puede realizarse a partir de anticuerpos consenso humanos o anticuerpos humanos individuales. Cuando sea necesario, pueden sustituirse residuos clave del anticuerpo donador en el armazón aceptor humano para conservar las conformaciones de CDR. La creación de modelos informáticos del anticuerpo puede usarse para ayudar a identificar tales residuos estructuralmente importante, véase el documento WO 99/48523.

Como alternativa, la humanización puede conseguirse mediante un proceso de "recubrimiento". Un análisis estadístico de regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana y murina únicas reveló que los patrones precisos de los residuos expuestos son diferentes en

anticuerpos humanos y murinos y la mayoría de las posiciones de superficie individuales tienen una fuerte preferencia por un pequeño número de residuos diferentes (véase Padlan y col. (1991) Mol. Immunol. 28: 489-498; y Pedersen y col. (1994) J. Mol. Biol. 235: 959-973). Por lo tanto es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano reemplazando los residuos expuestos en sus regiones marco conservadas que difieren de los hallados habitualmente en anticuerpos humanos. Debido a que puede correlacionarse la antigenicidad proteica con la accesibilidad a superficie, el reemplazo de los residuos de superficie puede ser suficiente para hacer a la región variable de ratón "invisible" para el sistema inmune humano (véase también Mark y col. (1994) in Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113: The pharmacology of Monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, 105-134). Este procedimiento de humanización se denomina "recubrimiento" porque sólo se altera la superficie del anticuerpo, los residuos de soporte no se ven alterados. Los enfoques alternativos adicionales incluyen el expuesto en el documento WO04/006955 y el procedimiento de Humaneering™ (Kalobios) que utiliza sistemas de expresión bacteriana y produce anticuerpos que son cercanos a la línea germinal humana en secuencia (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics enero 2007, San Diego, California).

Proteínas de enlace a antígenos biespecíficas

Una proteína de enlace a antígeno biespecífica es una proteína de

enlace a antígeno que tiene especificidades de enlace para cuando menos dos epítomos diferentes. Los procedimientos para preparar dichas proteínas de enlace a antígeno se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de las proteínas de enlace a antígeno

5 biespecíficas se basa en la coexpresión de dos pares de cadena H-cadena L de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de enlace, véase Millstein y col. (1983) Nature 305: 537-539; documento WO 93/08829; y Traunecker y col. (1991) EMBO 10: 3655-

10 3659. Debido a la mezcla aleatoria de cadenas H y L, se produce una mezcla potencial de diez estructuras de anticuerpos diferentes de las cuales sólo una tiene la especificidad de enlace deseada. Un enfoque alternativo implica fusionar los dominios variables con las especificidades de enlace deseadas a la región constante de cadena pesada que

15 comprende cuando menos parte de la región bisagra, regiones CH2 y CH3. La región CH1 que contiene el sitio necesario para la enlace de cadena ligera puede estar presente en cuando menos una de las fusiones. El ADN que codifica estas fusiones, y si se desea la cadena L, se insertan en

20 vectores de expresión separados y después se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas en un vector de expresión. En un enfoque, el anticuerpo biespecífico se compone de una

25 cadena H con una primera especificidad de enlace en una rama y un par de cadenas H-L, que proporcionan una segunda especificidad de enlace en la

otra rama, véase el documento WO 94/04690. Véase también Suresh y col. (1986) Methods in Enzymology 121: 210.

Fragmentos de enlace a Antígeno

5 Los fragmentos que carecen de la región constante carecen de la capacidad para activar el complemento por la vía clásica o mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Tradicionalmente dichos fragmentos se producen por la digestión proteolítica de anticuerpos intactos mediante, por ejemplo, digestión con papaína (véase por ejemplo, el
10 documento WO 94/29348) pero pueden producirse directamente a partir de células huésped transformadas de forma recombinante. Para la producción de ScFv, véase Bird y col. (1988) Science 242: 423-426. Además, pueden producirse fragmentos de enlace a antígeno usando una diversidad de
15 técnicas de ingeniería genética como se describe posteriormente.

Parece que los fragmentos de Fv tienen una menor energía de interacción de sus dos cadenas que los fragmentos de Fab. Para estabilizar la asociación de los dominios V_H y V_L , estos se han enlazado con péptidos (Bird y col. (1988) Science 242: 423-426; Huston y col. (1988) PNAS
20 85(16): 5879-5883), puentes disulfuro (Glockshuber y col. (1990) Biochemistry 29: 1362-1367) y mutaciones "bultos en huecos" (Zhu y col. (1997) Protein Sci., 6: 781-788). Pueden producirse fragmentos de ScFv por procedimientos bien conocidos para los expertos en la materia, véase
25 Whitlow y col. (1991) Methods Companion Methods Enzymol, 2: 97-105 y

Huston y col. (1993) *Int. Rev. Immunol* 10: 195-217. Pueden producirse ScFv en células bacterianas tales como *E. coli* o en células eucariotas. Una desventaja de ScFv es la monovalencia del producto, que impide una avidez aumentada debido a la enlace polivalente y su corta semivida. Los
5 intentos de solucionar estos problemas incluyen (ScFv')₂ bivalente producido de ScFv que contiene una cisteína C terminal adicional por acoplamiento químico (Adams y col. (1993) *Can. Res* 53: 4026-4034; y McCartney y col. (1995) *Protein Eng.* 8: 301-314) o por dimerización
10 específica de sitio espontánea de ScFv que contiene un residuo de cisteína C terminal no emparejado (véase Kipriyanov y col. (1995) *Cell. Biophys* 26: 187-204). Como alternativa, puede obligarse al ScFv a formar multímeros acortando engarce peptídico de 3 a 12 residuos para formar "diacuerpos", véase Holliger y col. (1993) *PNAS* 90: 6444-6448. Reducir el engarce aún
15 más puede dar como resultado trímeros de ScFv ("triacuerpos", véase Kortt y col. (1997) *Protein Eng* 10: 423-433) y tetrámeros ("tetracuerpos", véase Le Gall y col. (1999) *FEBS Lett*, 453: 164-168). La construcción de moléculas de ScFv bivalentes también puede conseguirse por fusión
20 genética con motivos de dimerización de proteínas para formar "minianticuerpos" (véase Pack y col. (1992) *Biochemistry* 31: 1579-1584) y "minicuerpos" (véase Hu y col. (1996) *Cancer Res.* 56: 3055-3061). También pueden producirse tandems de ScFv-Sc-Fv ((ScFv)₂) mediante el enlace de dos unidades de ScFv por un tercer engarce peptídico, véase
25 Kurucz y col. (1995) *J. Immol.* 154: 4576-4582. Pueden producirse

diacuerpos biespecíficos a través de la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadena sencilla que consisten en un dominio V_H de un anticuerpo conectado por un engarce corto al dominio V_L de otro anticuerpo, véase Kipriyanov y col. (1998) *Int. J. Can* 77: 763-772. La

5 estabilidad de dichos diacuerpos biespecíficos puede mejorarse mediante la introducción de puente disulfuro o mutaciones "bultos en huecos" como se ha descrito anteriormente o mediante la formación de diacuerpos de cadena sencilla (ScDb) en los que se conectan dos fragmentos híbridos de

10 ScFv a través de un engarce peptídico, véase Kontermann y col. (1999) *J. Immunol. Methods* 226:179-188. Están disponibles moléculas biespecíficas tetravalentes por ejemplo, mediante fusión de un fragmento de ScFv con el

domino CH3 de una molécula IgG o con un fragmento de Fab a través de la región bisagra, véase Coloma y col. (1997) *Nature Biotechnol.* 15: 159-163.

15 Como alternativa, se han creado moléculas biespecíficas tetravalentes mediante la fusión de diacuerpos de cadena sencilla biespecíficos (véase Alt y col. (1999) *FEBS Lett* 454: 90-94. También pueden formarse

moléculas biespecíficas tetravalentes más pequeñas mediante la

20 dimerización de tandems ScFv-ScFv con un engarce que contiene un motivo de hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller y col. (1998) *FEBS Lett* 432: 45-49) o una molécula de cadena sencilla que

comprende cuatro dominios variables de anticuerpo (V_H y V_L) en una orientación que evita el emparejamiento intramolecular (diacuerpo en

25 tandem, véase Kipriyanov y col. (1999) *J. Mol. Biol.* 293: 41-56). Pueden

crearse fragmentos biespecíficos $F(ab')_2$ mediante acoplamiento químico de fragmentos de Fab' o por heterodimerización a través de cremalleras de leucina (véase Shalaby y col. (1992) J. Exp. Med. 175: 217-225; y Kostelny y col. (1992), J. Immunol. 148: 1547-1553). También están disponibles

5 dominios V_H y V_L aislados (Domantis plc), véase los documentos US 6.248.516; US 6.291.158 y US 6.172.197.

Anticuerpos heteroconjugados

10 Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente formados usando cualquier procedimiento de entrecruzamiento conveniente. Véase, por ejemplo, el documento US 4.676.980.

Otras Modificaciones

15 Las proteínas de enlace a antígeno de la presente invención pueden comprender otras modificaciones para mejorar o cambiar sus funciones efectoras. La expresión "función efectora" como se usa en el presente documento pretende referirse a una o más de actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), respuestas mediadas por

20 actividad citotóxica dependiente de complemento (CDC), fagocitosis mediada por Fc y reciclaje de anticuerpo mediante el receptor de FcRn. Para anticuerpos IgG, las funcionalidades efectoras incluyendo ADCC y ADCP están mediadas por la interacción de la región constante de cadena

25 pesada con una familia de receptores Fcγ presentes en la superficie de

células inmunes. En seres humanos estos incluyen FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). La interacción entre la proteína de enlace a antígeno unida a antígeno y la formación del complejo Fc/Fcγ induce una serie de efectos que incluyen citotoxicidad, activación de célula inmune, fagocitosis y liberación de citoquinas inflamatorias.

Se cree que la interacción entre la región constante de una proteína de enlace a antígeno y diversos receptores de Fc (FcR) interviene en las funciones efectoras de la proteína de enlace a antígeno. Los efectos biológicos significativos pueden ser una consecuencia de la funcionalidad efectora, en particular, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fijación de complemento (citotoxicidad dependiente de complemento o CDC), y semivida/aclaramiento de la proteína de enlace a antígeno. Habitualmente, la capacidad para mediar en la función efectora requiere la enlace de la proteína de enlace a antígeno con un antígeno y no todas las proteínas de enlace a antígeno mediarán en cada función efectora.

Puede medirse la función efectora de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, mediante enlace de la FcγRIII con linfocitos citolíticos naturales o mediante FcγRI con monocitos/macrófagos para medir la función efectora de ADCC. Por ejemplo, una proteína de enlace a antígeno de la presente invención puede evaluarse con respecto a función efectora de ADCC en un ensayo de linfocitos citolíticos naturales. Los ejemplos de dichos ensayos pueden encontrarse en Shields y col, 2001 The Journal of

Biological Chemistry, Vol. 276, p 6591-6604; Chappel y col, 1993 The Journal of Biological Chemistry, Vol 268, p 25124-25131; Lazar y col, 2006 PNAS, 103; 4005-4010.

5 Los ejemplos de ensayo para determinar la función CDC incluyen el descrito en 1995 J Imm Meth 184: 29-38.

Algunos isotipos de regiones constantes humanas, en particular isotipos IgG4 e IgG2, esencialmente carecen de las funciones de a) activación de complemento por la vía clásica y b) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Pueden llevarse a cabo diversas modificaciones a la región constante de cadena pesada de proteínas de enlace a antígeno dependiendo de la propiedad efectora deseada. Se ha descrito que regiones constantes de IgG1 que contienen mutaciones específicas reducen la enlace a receptores de Fc y por lo tanto reducen ADCC y CDC (Duncan y col. Nature 1988, 332; 563-564; Lund y col. J. Immunol. 1991, 147; 2657-2662; Chappel y col. PNAS 1991, 88; 9036-9040; Burton y Woof, Adv. Immunol. 1992, 51; 1-84; Morgan y colaboradores, Immunology 1995, 86; 319-324; Hezareh y colaboradores, J. Virol. 2001, 75 (24); 12161-12168).

20 Pueden llevarse a cabo diversas modificaciones de la región Fc de anticuerpos dependiendo de la propiedad deseada. Por ejemplo, mutaciones específicas en la región Fc para hacer a un anticuerpo que de otro modo sería lítico, no lítico se detallan en los documentos EP 0629 240 y EP 0307 434 o una puede incorporar un epítipo de enlace a receptor de

25

recuperación en el anticuerpo para aumentar la semivida en suero, véase el documento US 5.739.277. Los receptores de Fcγ humanos incluyen FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y col. (2001) J. Biol. Chem 276: 6591-6604 demostraron que un conjunto habitual de

5 residuos de IgG1 está implicado en la enlace de todos los FcγRs, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan distintos sitios fuera de este conjunto común. Un grupo de residuos de IgG1 redujeron la enlace con todos los FcγR cuando se cambió a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-

10 239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y se agrupan cerca de la bisagra que une CH1 y CH2. Aunque FcγRI utiliza sólo el conjunto común de residuos de IgG1 para el enlace, FcγRII y FcγRIII interaccionan con residuos distintos además del conjunto común. La alteración de algunos residuos redujo la enlace solamente a FcγRII (por ejemplo, Arg-292) o

15 FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes mostraron enlace mejorada a FcγRII o FcγRIII pero no influyen en la enlace al otro receptor (por ejemplo, Ser-267Ala mejoró la enlace a FcγRII pero la enlace a FcγRIII no se vio afectada). Otras variantes mostraron un enlace mejorada a FcγRII o FcγRIII con reducción en la enlace al otro receptor (por ejemplo, Ser-

20 298Ala mejoró la enlace a FcγRIII y redujo la enlace a FcγRII). Para FcγRIIIa, las mejores variantes de IgG1 de enlace tenían sustituciones de alanina combinadas en Ser-298, Glu-333 y Lys-334. Se cree que el receptor FcRn neonatal está implicado en el aclaramiento de anticuerpo y

25 la transcitosis a través de tejido (véase Junghans (1997) Immunol. Res 16:

29-57; y Ghetie y col. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766). Los
residuos de IgG1 humana que se determina que interaccionan
directamente con FcRn humano incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307,
Gln311, Asn434 e His435. Las sustituciones en cualquiera de las
5 posiciones descritas en esta sección pueden permitir una semivida en
suero aumentada y/o propiedades efectoras alteradas de los anticuerpos.

Otras modificaciones incluyen variantes de glucosilación de los
anticuerpos. Se sabe que la glucosilación de anticuerpos en posiciones
10 conservadas en sus regiones constantes tiene un efecto importante en la
función de anticuerpo, particularmente funciones efectoras tales como las
descritas anteriormente, véase, por ejemplo, Boyd y col. (1996) Mol.
Immunol. 32: 1311-1318. Las variantes de glucosilación de los anticuerpos
o fragmentos de enlace a antígeno de los mismos en las se añaden,
15 sustituyen, suprimen o modifican uno o más residuos de carbohidrato están
contempladas. La introducción de un motivo de asparagina-X-serina o
asparagina-X-treonina crea un sitio potencial de enlace enzimática de
residuos de carbohidrato y puede por lo tanto usarse para manipular la
glucosilación de un anticuerpo. En Raju y col. (2001) Biochemistry 40:
20 8868-8876 la sialilación terminal de una inmunoadhesina de TNFR-IgG se
aumentó a través de un procedimiento de regalactosilación y/o resialilación
usando beta-1,4-galactosil-transferasa y/o alfa,2,3 sialil-transferasa. El
aumento de la sialilación terminal se cree que aumenta la semivida de la
25 inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de las

glucoproteínas, típicamente se producen como una mezcla de glucoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando se producen anticuerpos en células eucariotas, particularmente de mamíferos. Se ha desarrollado una diversidad de procedimientos para elaborar glucoformas definidas, véase Zhang y col. (2004) Science 303: 371; Sears y col. (2001) Science 291: 2344; Wacker y col. (2002) Science 298: 1790; Davis y col. (2002) Chem. Rev. 102: 579; Hang y col. (2001) Acc. Chem. Res 34: 727. Los anticuerpos (por ejemplo, del isotipo de IgG, por ejemplo, IgG1) como se describen en el presente documento pueden comprender un número definido (por ejemplo, 7 o menos, por ejemplo, 5 o menos, tales como dos o una sencilla) de glucoformas.

Los anticuerpos pueden estar o no acoplados a un polímero no proteínico tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquileo. La conjugación de proteínas con PEG es una técnica establecida para aumentar la semivida de proteínas, así como reducir la antigenicidad e inmunogenicidad de proteínas. El uso de PEGilación con diferentes pesos y estilos moleculares (lineales o ramificados) se ha investigado con anticuerpos intactos así como fragmentos de Fab', véase Koumenis y col. (2000) Int. J. Pharmaceut. 198: 83-95.

Procedimientos de Producción

Pueden producirse proteínas de enlace a antígeno en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock y col. (1999) J. Immunol. Methods 231: 147-157), pollos (véase Morrow (2000) Genet. Eng. News 20:

1-55), ratones (véase Pollock y col.) o plantas (véase Doran (2000) Curr. Opinion Biotechnol. 11: 199-204; Ma (1998) Nat. Med. 4: 601-606; Baez y col. (2000) BioPharm 13: 50-54; Stoger y col. (2000) Plant Mol. Biol. 42: 583-590).

5 También pueden producirse proteínas de enlace a antígeno mediante síntesis química. Sin embargo, las proteínas de enlace a antígeno se producen típicamente usando tecnología de cultivo celular recombinante bien conocida para los expertos en la materia. Un
10 polinucleótido que codifica la proteína de enlace a antígeno se aísla e inserta en un vector replicable, tal como un plásmido, para su clonación (amplificación) o expresión adicional. Un sistema de expresión es un sistema de glutamato sintetasa (tal como el comercializado por Lonza Biologics), particularmente cuando la célula huésped es CHO o NS0. El
15 polinucleótido que codifica la proteína de enlace a antígeno se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas oligonucleotídicas). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmido, virus, fago, transposones, minicromosomas de los que se usan típicamente los plásmidos. Generalmente dichos vectores incluyen
20 adicionalmente una secuencia de señal, origen de replicación, uno o más genes indicadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas operativamente al polinucleótido de la proteína de enlace a antígeno para facilitar la expresión. El polinucleótido
25 que codifica las cadenas ligera y pesada puede insertarse en vectores

separados e introducirse (por ejemplo, por transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula huésped simultáneamente o secuencialmente o, si se desea, la cadena ligera y la cadena pesada pueden insertarse ambas en el mismo vector antes de
5 dicha introducción.

La optimización de codones puede usarse con la intención de que el nivel de proteína total producida por la célula huésped sea mayor cuando se transfecta con codón optimizado en comparación con el nivel cuando se transfecta con la secuencia natural. Se han publicado varios
10 procedimientos (Nakamura y col. (1996) Nucleic Acids Research 24: 214-215; documento W098/34640; documento W097/11086). Debido a la redundancia del código genético, polinucleótidos alternativos a los desvelados en el presente documento (particularmente los que tienen el
15 codón optimizado para la expresión en una célula huésped dada) también pueden codificar las proteínas de enlace a antígeno descritas en el presente documento. El uso del codón de la proteína de enlace a antígeno de la presente invención de los mismos puede modificarse para alojar
preferencia codónica de la célula huésped tal como para aumentar la
20 producción de transcrito y/o producto (por ejemplo, Hoekema y col Mol Cell Biol 1987 7(8): 2914-24). La selección de codones puede basarse en compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

Secuencias de señales

25 Pueden producirse proteínas de enlace a antígeno como una

proteína de fusión con una secuencia de señal heteróloga que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N terminal de la proteína madura. La secuencia de señal debería reconocerse y procesarse por la célula huésped. Para las células huésped procariotas, la secuencia de señal puede ser por ejemplo, líderes de una fosfata alcalina, penicilinasa, o enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levaduras las secuencias de señales pueden ser por ejemplo, una líder de invertasa de levadura, líder de factor α o líderes de fosfatasa ácida, véase por ejemplo, el documento WO90/13646. En sistemas celulares de mamíferos, las secuencias líderes secretoras virales tales como señal gD de herpes simple y una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa pueden ser adecuadas. Típicamente, la secuencia de señal está ligada en fase de lectura con el ADN que codifica la proteína de enlace a antígeno.

Origen de replicación

Los orígenes de replicación son bien conocidos en la técnica, siendo pBR322 adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el plásmido 2 μ para la mayoría de las levaduras y diversos orígenes virales tales como SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamífero. En general, el componente de origen replicación no se necesita para vectores de expresión de mamífero, sino que puede usarse SV40 ya que contiene el promotor temprano.

Marcador de selección

Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren

resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementan deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes no disponibles en el medio complejo o (c) combinaciones de los dos. El esquema de selección puede implicar
5 detener el crecimiento de la célula huésped. Las células que se han transformado satisfactoriamente con los genes que codifican la proteína de enlace a antígeno sobreviven debido, por ejemplo, a la resistencia a un fármaco conferida por el marcador de selección co-suministrado. Un
10 ejemplo es el marcador de selección DHFR en el que los transformantes se cultivan en presencia de metotrexato. Las células pueden cultivarse en presencia de cantidades crecientes de metotrexato para amplificar el número de copias del gen exógeno de interés. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para la selección con DHFR. Un ejemplo
15 adicional es el sistema de expresión de glutamato sintetasa (Lonza Biologics). Un ejemplo de un gen de selección para uso en levaduras es el gen *trp1*, véase Stinchcomb y col. (1979) Nature 282: 38.

Promotores

20 Los promotores adecuados para expresar proteínas de enlace a antígeno se enlazan operativamente al ADN/polinucleótido que codifica la proteína de enlace a antígeno. Los promotores para huéspedes procariotas incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa, promotores de fosfatasa alcalina, triptófano e híbridos, tales
25 como Tac. Los promotores adecuados para la expresión en células de

levadura incluyen 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucocinasa. Los promotores de levadura inducibles
5 incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o la utilización de maltosa/galactosa.

Los promotores para la expresión en sistemas de células de
10 mamífero incluyen promotores virales tales como polioma, viruela aviar y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular, el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV) y el virus de los simios 40 temprano o tardío. Por
15 supuesto, la elección del promotor se basa en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión. Un primer plásmido puede comprender el promotor de RSV y/o SV40 y/o CMV, ADN que codifica la región variable de cadena ligera (V_L), la región κC junto con marcadores de selección de resistencia a neomicina y ampicilina y un segundo plásmido
20 que comprende un promotor de RSV o SV40, ADN que codifica la región variable de cadena pesada (V_H), ADN que codifica la región constante $\gamma 1$, DHFR y marcadores de resistencia a ampicilina.

Elemento potenciador

25 Cuando es apropiado, por ejemplo, para la expresión en eucariotas

superiores, puede usarse un elemento potenciador unido operativamente al elemento promotor en un vector. Las secuencias potenciadoras de mamífero incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina. Como alternativa, se puede usar un

5 elemento potenciador de un virus de células eucariotas tal como el potenciador de SV40 (en pb100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma, el potenciador de baculovirus o el locus IgG2a murino (véase el documento WO04/009823).

10 El potenciador puede localizarse en el vector en un sitio cadena arriba del promotor. Como alternativa, el potenciador puede localizarse en cualquier sitio, por ejemplo, dentro de la región no traducida o cadena abajo de la señal de poliadenilación. La elección y colocación del potenciador puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para

15 la expresión.

Poliadenilación/terminación

En sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación se enlazan operativamente a un ADN/polinucleótido que codifica la proteína de enlace a antígeno. Dichas señales típicamente se ponen en posición 3' de la fase

20 de lectura abierta. En sistemas de mamífero, los ejemplos no limitantes incluyen señales derivadas de hormonas de crecimiento, el factor de elongación-1 alfa y genes virales (por ejemplo, SV40) o repeticiones terminales largas retrovirales. En sistemas de levadura, los ejemplos no

25 limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas

de los genes de fosfoglicerato cinasa (PGK) y alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En sistemas procariotas, las señales de poliadenilación típicamente no son necesarias y en su lugar es habitual emplear secuencias terminadoras más cortas y más definidas. La elección de las secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en una compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

Otros procedimientos/elementos para obtener rendimientos

mejorados

Además de lo anterior, otras características que pueden emplearse para mejorar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de cromatina, intrones y modificación de codones específicos de la célula huésped.

Células huésped

Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican proteínas de enlace a antígenos son células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Las células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacterias tales como *Escherichia* por ejemplo, *E. coli* (por ejemplo, ATCC 31446, 31537, 27325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (véase el documento DD 266 710), *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células huésped de levadura,

Saccharomyces cerevisiae, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, ATCC 16.045, 12.424, 24178, 56.500), *yarrowia* (documento EP402.226), *Pichia pastoris* (documento EP 183 070, véase también Peng y col. (2004) J. Biotechnol 108: 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesia* (documento EP 244 234), penicilina, *Tolypocladium* y también se contemplan hospedadores *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped eucariotas superiores incluyen células de mamífero tales como COS-1 (ATCC N° CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), la línea de riñón embrionario humano 293, células de riñón de cría de hámster (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC N°: CRL 10314), 293 (ATCC N° CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (por ejemplo, CHO-K1, ATCC N°: CCL 61, la línea celular DHFR-CHO tal como DG44 (véase Urlaub y col. (1986) Somatic Cell Mol.12: 555-556), particularmente las líneas de células CHO adaptadas para el cultivo en suspensión, células de sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células de riñón canino (ATCC CCL 34), células de pulmón humano (ATCC CCL 75), Hep G2 y células de mieloma o linfoma, por ejemplo, NS0 (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

Dichas células huésped también pueden modificarse adicionalmente por ingeniería genética o adaptarse para modificar la calidad, función y/o rendimiento de la proteína de enlace a antígeno. Los ejemplos no limitantes incluyen la expresión de enzimas modificadoras específicas (por ejemplo,

glicosilación) y chaperonas de plegamiento de proteínas.

Procedimientos de Cultivo Celular

Las células huésped transformadas con vectores que codifican proteínas de enlace a antígeno pueden cultivarse por cualquier
5 procedimiento conocido por los expertos en la materia. Las células huésped pueden cultivarse en matraces de agitación, frascos cilíndricos o sistemas de fibras huecas, pero para la producción a gran escala se usan particularmente reactores de depósito agitado para cultivos en suspensión. Los depósitos agitados pueden adaptarse para aireación usando, por
10 ejemplo, rociadores, tabiques deflectores o impulsores de baja cizalla. Para las columnas de burbujas y reactores airlift (de agitación neumática), puede usarse la aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células huésped se cultivan en un medio de cultivo sin suero, el medio se
15 suplementa con un agente protector de los linfocitos Tal como Pluronic F-68 para ayudar a prevenir lesiones celulares como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de la célula huésped, pueden usarse microsoportes como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes de anclaje o las células pueden adaptarse al cultivo en
20 suspensión (lo cual es típico). El cultivo de las células huésped, particularmente células huésped de invertebrados, puede utilizar una diversidad de modos de operación tales como procesamiento semicontinuo, procesamiento en lotes repetidos (véase Drapeau y col.
25 (1994) Cytotechnology 15: 103-109), un proceso en lotes prolongado o

cultivo de perfusión. Aunque las células huésped de mamífero transformadas de forma recombinante pueden cultivarse en medios que contienen suero tales como suero bovino fetal (FCS), por ejemplo, dichas células huésped se cultivan en medios sin suero sintéticos tales como los
5 descritos en Keen y col. (1995) *Cytotechnology* 17: 153-163, o medios disponibles en el mercado tales como ProCHO-CDM o UltraCHO^{MR} (Cambrex NJ, USA), suplementados cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como
10 insulina recombinante. El cultivo sin suero de las células huésped puede requerir que esas células se adapten al crecimiento en condiciones sin suero. Un enfoque de adaptación es cultivar dichas células huésped en medio que contiene suero y cambiar repetidamente el 80 por ciento del medio de cultivo por el medio sin suero de forma que las células huésped
15 aprendan a adaptarse a las condiciones sin suero (véase, por ejemplo, Scharfenberg y col. (1995) en *Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery y col. eds, 619-623, Kluwer Academic Publishers).

20 Las proteínas de enlace a antígeno secretadas al medio pueden recuperarse y purificarse usando una diversidad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso deseado. Por ejemplo, el uso de proteínas de enlace a antígeno para el tratamiento de pacientes humanos típicamente exige una pureza de cuando menos el 95
25 por ciento, más típicamente una pureza del 98 por ciento o del 99 por

ciento o mayor (en comparación con el medio de cultivo bruto). El desecho celular del medio de cultivo típicamente se retira usando centrifugación seguida de una etapa de clarificación del sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración profunda. Se dispone de una diversidad de técnicas distintas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxapatita (HA), cromatografía de afinidad (que opcionalmente implica un sistema de marcaje de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, véase el documento US 5.429.746). Los anticuerpos, después de diversas etapas de clarificación, pueden capturarse usando cromatografía de afinidad de proteína A o G. Después pueden realizarse etapas de cromatografía adicionales tales como cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía HA, intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión molecular y precipitación con sulfato amónico. También pueden emplearse diversas etapas de eliminación de virus (por ejemplo, nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (por ejemplo, monoclonal) que comprende cuando menos 75 miligramos/mililitro o más, o 100 miligramos/mililitro o más, de la proteína de enlace a antígeno. Dichas preparaciones carecen sustancialmente de formas agregadas de proteínas de enlace a antígeno.

Pueden usarse sistemas bacterianos para la expresión de fragmentos de enlace a antígeno. Dichos fragmentos pueden localizarse

intracelularmente, dentro del periplasma o secretarse extracelularmente. Las proteínas insolubles pueden extraerse y replegarse para formar proteínas activas de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia, véase Sanchez y col. (1999) J. Biotechnol. 72: 13-20, y Cupit y col. (1999) Lett Appl Microbiol 29: 273-277.

Composiciones Farmacéuticas

Los términos enfermedades, trastornos y afecciones se usan indistintamente. Las preparaciones purificadas de una proteína de enlace a antígeno como se describe en el presente documento pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de las enfermedades humanas descritas en el presente documento. La composición farmacéutica puede usarse en el tratamiento de enfermedades en las que la IL-7 contribuye a la enfermedad o en las que será beneficiosa la inhibición/neutralización de la señalización mediada por IL-7R. La composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento.

La preparación farmacéutica puede comprender una proteína de enlace a antígeno en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La proteína de enlace a antígeno puede administrarse sola, o como parte de una composición farmacéutica.

Típicamente, dichas composiciones comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable como se conoce y exige la práctica

farmacéutica aceptable, véase, por ejemplo, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (1980) Mack Publishing Co. Los ejemplos de dichos vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, opcionalmente tamponada con
5 tampones adecuados a un pH dentro de un intervalo de 5 a 8.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inyección o infusión continua (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraportal). Dichas
10 composiciones convenientemente carecen de materia visible en forma de partículas. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender entre 1 miligramo y 10 gramos de proteína de enlace a antígeno, por ejemplo, entre 5 miligramos y 1 gramo de proteína de enlace a antígeno. Como alternativa, la composición puede comprender entre 5 miligramos y 500
15 miligramos, por ejemplo, entre 5 miligramos y 50 miligramos.

Los procedimientos para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas son bien conocidos para los expertos en la materia. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender entre 1 miligramo y 10
20 gramos de proteína de enlace a antígeno en forma de dosificación unitaria, opcionalmente junto con instrucciones para el uso. Las composiciones farmacéuticas pueden liofilizarse (secarse por congelación) para la reconstitución antes de la administración de acuerdo con procedimientos bien conocidos o evidentes para los expertos en la materia. Cuando los
25 anticuerpos tienen un isotipo IgG1, puede añadirse un quelante de cobre,

tal como citrato (por ejemplo, citrato sódico) o EDTA o histidina a la composición farmacéutica para reducir el grado de degradación mediada por cobre de anticuerpos de este isotipo, véase el documento EP0612251. Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender un
5 solubilizante tal como una base de arginina, un agente detergente/anti-agregación tal como polisorbato 80, y un gas inerte tal como nitrógeno para reemplazar el oxígeno del espacio superior del vial.

Las dosis eficaces y las pautas de tratamiento para administrar la
10 proteína de enlace a antígeno generalmente se determinan empíricamente y pueden depender de factores tales como la edad, peso y estado de salud del paciente y la enfermedad o trastorno a tratar. Dichos factores están dentro del ámbito del médico a cargo del caso. Puede encontrarse una directriz en la selección de las dosis apropiadas, por ejemplo, en Smith y
15 col (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New York. De esta manera, la proteína de enlace a antígeno de la invención puede administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz.

La dosificación de proteína de enlace a antígeno administrada a un
20 sujeto generalmente está comprendida entre 1 microgramo/ kilogramo y 150 microgramos/kilogramo, entre 0.1 miligramos/ kilogramo y 100 miligramos/kilogramo, entre 0.5 miligramos/ kilogramo y 50 miligramos/kilogramo, entre 1 y 25 miligramos/ kilogramo o entre 1 y 10 miligramos/kilogramo del peso corporal del sujeto. Por ejemplo, la dosis
25 puede ser de 10 miligramos/kilogramo, 30 miligramos/kilogramo o 60

miligramos/kilogramo. La proteína de enlace a antígeno puede administrarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular.

Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados, opcionalmente en formas de dosificación unitarias. Por ejemplo, la dosis puede administrarse por vía subcutánea, una vez cada 14 o 28 días en forma de múltiples subdosis cada día de administración.

La administración de una dosis puede ser por infusión intravenosa, típicamente durante un período de 15 minutos a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas, o de 2 a 6 horas. Esto puede dar como resultado menos efectos secundarios tóxicos.

La administración de una dosis puede repetirse una o más veces cuando sea necesario, por ejemplo, tres veces al día, una vez al día, una vez cada 2 días, una vez por semana, una vez cada quince días, una vez al mes, una vez cada 3 meses, una vez cada 6 meses o una vez cada 12 meses. Las proteínas de enlace a antígeno pueden administrarse por una terapia de mantenimiento, por ejemplo, una vez por semana durante un período de 6 meses o más. Las proteínas de enlace a antígeno pueden administrarse por una terapia intermitente, por ejemplo, se administra durante un período de 3 a 6 meses y después deja de administrarse la dosis durante 3 a 6 meses, seguido de la administración de proteínas de

enlace a antígeno de nuevo durante 3 a 6 meses, y así sucesivamente en un ciclo.

La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de IL-17 en una muestra biológica. Pueden utilizarse otros medios para
5 determinar o ajustar la dosificación, incluyendo pero sin limitación marcadores biológicos ("biomarcadores") de farmacología, mediciones de la masa muscular y/o función, seguridad, tolerancia y respuesta terapéutica. La proteína de enlace a antígeno puede administrarse en una
10 cantidad y durante un periodo eficaz para regular negativamente la actividad señalización mediada por IL-7 en el sujeto.

La proteína de enlace a antígeno puede administrarse al sujeto de tal forma que la terapia se dirija a un sitio particular. Por ejemplo, la proteína de enlace a antígeno puede inyectarse localmente en el músculo, por
15 ejemplo, el músculo esquelético.

La proteína de enlace a antígeno puede usarse en combinación con uno o más agentes terapéuticamente activos distintos, por ejemplo: inmunomoduladores tales como el interferón beta (IFN β -1a o IFN β -1b) y acetato de glatirámico, inmunosupresores tales como ciclofosfamida,
20 metotrexato, azatioprina, cladribina, ciclosporina y mitoxantrona, otras terapias inmunes tales como globulina inmune intravenosa (IVIg), reemplazo de plasma y sulfasalazina. El producto terapéutico adicional puede administrarse de una manera (dosificación, programa de tiempo, mecanismo) prescrita por un médico. En una modalidad, el agente
25

terapéutico adicional puede administrarse de forma simultánea o secuencial o separada de la proteína de enlace a antígeno de la presente invención. En una modalidad, el agente terapéutico adicional y la proteína de enlace a antígeno se administran de tal forma que solapan sus efectos farmacológicos en el paciente; en otras palabras, ejercen sus efectos biológicos sobre el paciente al mismo tiempo.

Cuando la proteína de enlace a antígeno se usa en combinación con otros agentes terapéuticamente activos, los componentes individuales pueden administrarse conjunta o separadamente, secuencial o simultáneamente, o en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas, por cualquier vía apropiada. Si se administran por separado o secuencialmente, la proteína de enlace a antígeno y el agente o agentes terapéuticamente activos pueden administrarse en cualquier orden.

Las combinaciones mencionadas anteriormente pueden presentarse para uso en forma de una sola formulación farmacéutica que comprende una combinación como se ha definido anteriormente opcionalmente junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Cuando se combinan en la misma formulación, se apreciará que los componentes tienen que ser estables y compatibles entre sí y con los demás componentes de la formulación y pueden formularse para administración. Cuando se formulan por separado, pueden proporcionarse en cualquier formulación conveniente, por ejemplo, de una manera conocida para las proteínas de enlace a antígeno en la técnica.

Cuando está en combinación con un segundo agente terapéutico activo contra la misma enfermedad, la dosis de cada componente puede diferir de la utilizada cuando la proteína de enlace a antígeno se usa sola. Las dosis apropiadas se apreciarán fácilmente por los expertos en la materia.

La proteína de enlace a antígeno y el agente o agentes terapéuticamente activos pueden actuar sinérgicamente. En otras palabras, la administración de la proteína de enlace a antígeno y el agente o agentes terapéuticamente activos en combinación puede tener un mayor efecto sobre la enfermedad, trastorno o afección descrita en el presente documento que la suma de los efectos de cada uno individualmente.

La composición farmacéutica puede comprender un kit de partes de la proteína de enlace a antígeno junto con otros medicamentos, opcionalmente con instrucciones para el uso. Por conveniencia, el kit puede comprender los reactivos en cantidades previamente determinadas con instrucciones para el uso.

Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se usan en el presente documento indistintamente. El sujeto típicamente es un ser humano. El sujeto también puede ser un mamífero, tal como un ratón, rata o primate (por ejemplo, un tití o mono). El sujeto puede ser un animal no humano. Las proteínas de enlace a antígeno también pueden tener uso veterinario. El sujeto a tratar puede ser un animal de granja, por ejemplo, una vaca o toro, oveja, cerdo, buey, cabra o caballo, o puede ser un animal doméstico

tal como un perro o gato. El animal puede ser de cualquier edad, o un animal adulto maduro.

El tratamiento puede ser terapéutico, profiláctico o preventivo. El sujeto puede ser uno que lo necesite. Los que necesitan tratamiento
5 pueden incluir individuos que ya padecen una enfermedad médica particular además de los que pueden desarrollar la enfermedad en el futuro.

De esta manera, la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento puede usarse para el tratamiento profiláctico o
10 preventivo. En este caso, la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento se administra a un individuo para prevenir o retrasar el inicio de uno o más aspectos o síntomas de la enfermedad. El sujeto puede ser asintomático. El sujeto puede tener una predisposición genética a la
15 enfermedad. Una cantidad profilácticamente eficaz de la proteína de enlace a antígeno se administra a dicho individuo. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que previene o retrasa el inicio de uno o más aspectos o síntomas de una enfermedad descrita en el presente documento.

20 La proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento también puede usarse en procedimientos de terapia. El término "terapia" incluye el alivio, reducción o prevención de cuando menos un aspecto o síntoma de una enfermedad. Por ejemplo, la proteína de enlace a antígeno
25 descrita en el presente documento puede usarse para mejorar o reducir

uno o más aspectos o síntomas de una enfermedad descrita en el presente documento.

La proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento se usa en una cantidad eficaz para el tratamiento terapéutico, profiláctico o preventivo. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento es una cantidad eficaz para mejorar o reducir uno o más aspectos o síntomas de la enfermedad. La proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento también puede usarse para tratar, prevenir o curar la enfermedad descrita en el presente documento.

La proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento puede tener un efecto generalmente beneficioso sobre la salud del sujeto, por ejemplo, puede aumentar la longevidad esperada del sujeto.

No es necesario que la proteína de enlace a antígeno descrita en el presente documento consiga una cura completa, o erradique todos los síntomas o manifestaciones de la enfermedad para constituir un tratamiento terapéutico viable. Como se reconoce en el campo pertinente, los fármacos empleados como agentes terapéuticos pueden reducir la gravedad de un estado de enfermedad dado, pero no es necesario que eliminen cada manifestación de la enfermedad para considerarse agentes terapéuticos útiles. De forma similar, un tratamiento administrado profilácticamente no necesita ser completamente eficaz para prevenir el inicio de una enfermedad para constituir un agente profiláctico viable.

Simplemente es suficiente reducir el impacto de una enfermedad (por ejemplo, reduciendo el número o gravedad de sus síntomas, o aumentando la eficacia de otro tratamiento, o produciendo otro efecto beneficioso), o reducir la probabilidad de que se produzca la enfermedad (por ejemplo, 5 retrasando el inicio de la enfermedad) o el empeoramiento de un sujeto.

Las proteínas de enlace a antígeno de la presente invención pueden usarse en la terapia de la esclerosis múltiple y en otras enfermedades autoinmunes o inflamatorias, particularmente aquellas en las que están 10 implicados linfocitos T_H17 patógenos. Dichas enfermedades están asociadas con altos niveles de expresión de IL-17. Se han notificado niveles elevados de IL-17 en suero y LCR de pacientes con esclerosis múltiple (EM) (Matusevicius D., y col, Mult. Scler. 5, 101-104; 1999) y en el líquido sinovial obtenido de pacientes con artritis reumatoide. La IL-17 15 también se ha implicado en la psoriasis (Homey y col.; J. Immunol 164 (12):6621-32; 2000), mientras que Hamzaoui y col notificaron altos niveles de IL-17 en la enfermedad de Behcet (Scand. J. Rheumatol.; 31:4, 205-210, 2002). También se han observado niveles elevados de IL-17 en lupus eritematoso sistémico (LES) (Wong y col.; Lupus 9 (8):589-93; 2000). 20

La inhibición de la señalización mediada por el receptor de IL-7 también puede ser útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (no autoinmunes) en las que se ha implicado un nivel elevado de IL-17, tales como asma.

25 Por consiguiente, las enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes

de la invención incluyen enfermedades inflamatorias de la piel que incluyen psoriasis y dermatitis atópica; esclerodermia sistémica y esclerosis; enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn; colitis ulcerosa; trastornos de isquemia-reperfusión que incluyen lesión de
5 reperfusión de tejido quirúrgico, afecciones isquémicas del miocardio tales como infarto de miocardio, paro cardíaco, reperfusión después de una cirugía cardíaca y constricción después de angioplastia coronaria transluminal percutánea, ictus y aneurismas aórticos abdominales, edema
10 cerebral secundario a ictus; traumatismo craneal, choque hipovolémico; asfixia; síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto; lesión pulmonar aguda; enfermedad de Behcet; dermatomiositis; polimiositis; esclerosis múltiple (EM); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; osteoartritis; lupus, nefritis; enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide (RA),
15 síndrome de Sjorgen, vasculitis; enfermedades que implican diapedesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC), síndrome de lesión multiorgánica secundaria a septicemia o traumatismo; hepatitis alcohólica; neumonía bacteriana; enfermedades mediadas por
20 complejos antígeno-anticuerpo incluyendo glomerulonefritis; septicemia; sarcoidosis; respuestas inmunopatológicas a trasplantes de tejidos/órganos; inflamaciones del pulmón, incluyendo pleuritis, alveolitis, vasculitis, neumonía, bronquitis crónica, bronquiectasia, panbronquiolitis difusa, neumonitis de hipersensibilidad, fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y
25 fibrosis quística; artritis psoriásica; neuromielitis óptica, síndrome de

Guillain-Barre (GBS), COPD, diabetes tipo 1, etc.

En particular, los antagonistas de la presente invención pueden ser útiles en la terapia de esclerosis múltiple, en todas sus formas, incluyendo neuromielitis óptica. Se predice que el tratamiento con un antagonista de la presente invención es el más eficaz cuando se administra en el contexto de una enfermedad inflamatoria activa, es decir, cuando se usa en el tratamiento de un síndrome aislado clínicamente o formas recurrentes de EM. Estos estados de enfermedad pueden definirse clínicamente y/o por criterios de formación de imágenes tales como potenciación con gadolinio u otras técnicas más sensibles, y/u otros biomarcadores de enfermedad activa aún no definidos. Particularmente, los antagonistas de la invención pueden usarse para tratar EMRR (mediante administración intravenosa, subcutánea, oral o intramuscular) cuando los pacientes están empezando o están en recaída. En una modalidad, el antagonista de la invención se administra al paciente al inicio de la recaída, o cuando han transcurrido 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días o 10 días desde el inicio de la recaída.

Las proteínas de enlace a antígeno de la invención pueden enlazarse a CD127. En una modalidad, las proteínas de enlace a antígeno de la invención pueden antagonizar el efecto biológico del receptor de IL-7.

En una modalidad, las proteínas de enlace a antígeno son capaces de

antagonizar cuando menos uno de: la expansión de T_H17 mediada por el receptor de IL-7 y la supervivencia de T_H17 mediada por el receptor de IL-7.

5 Los términos inhibir, antagonizar y neutralizar se usan en el presente documento como sinónimos. Ningún término pretende sugerir la necesidad de una neutralización total; también se contempla la neutralización parcial – que corresponde a una reducción pero no una eliminación completa del efecto biológico.

10 La expansión y/o supervivencia de T_H17 mediada por el receptor de IL-7 puede observarse a un nivel celular por un aumento o mantenimiento del número de linfocitos T_H17 , o por un aumento en la relación del número de linfocitos T_H17 en comparación con el número de otros linfocitos T CD4+, o más específicamente por un aumento en la relación de linfocitos
15 $T_H17:T_H1$, la relación de linfocitos $T_H17:T_{reg}$, la relación de linfocitos (T_H17 más T_H1): T_{reg} y/o la relación de linfocitos $T_H17:(T_H1$ más $T_{reg})$.

A nivel molecular, puede observarse la expansión y/o supervivencia de T_H17 por un aumento en la producción de IL-17 por una población de linfocitos T CD4+ (o por una población de linfocitos T_H17). En una
20 modalidad, por lo tanto, las proteínas de enlace a antígeno de la invención reducen la producción de IL-17 por una población de linfocitos T CD4+. La expansión y supervivencia de T_H17 mediada por el receptor de IL-7 también puede observarse por un aumento en la producción de IFN- γ por
25 una población de linfocitos T CD4+ (o por una población de linfocitos T_H17).

De esta manera, en una modalidad, las proteínas de enlace a antígeno de la invención antagonizan (reducen) la producción de IFN- γ por una población de linfocitos T CD4+. A nivel molecular, las proteínas de enlace a antígeno de la invención pueden inhibir la fosforilación de STAT-5 mediada por el receptor de IL-7.

A nivel molecular, se puede observar y medir el efecto bloqueante de las proteínas de enlace a antígeno de la invención mediante ensayos tales como P-STAT5 o Bcl-2 inducido por IL-7. A nivel celular, se puede observar y medir el efecto bloqueante mediante ensayos tales como la secreción por Th17 de IL-17 o IFN γ . Se describen ensayos de ejemplo en la solicitud PCT N° PCT/US2009/053136 (WO2010/017468).

En un ensayo PSTAT-5 de ejemplo, se estimulan células mononucleares de sangre periférica con IL-7 en presencia y ausencia de un agente de ensayo. Las células posteriormente se evalúan cuantitativamente con respecto al nivel de PSTAT-5, por ejemplo, por tinción para PSTAT-5 (por ejemplo, con un anticuerpo anti-PSTAT-5 marcado, tal como Anti-Stat5 de ratón Alexa Fluor®647 (pY694, BD [N° 612599])) seguido de separación celular activada por fluorescencia. Los niveles de STAT-5 fosforilado también podrían determinarse por ELISA. Los agentes que reducen el nivel de STAT-5 fosforilado pueden ser candidatos terapéuticos potenciales para enfermedades autoinmunes.

El antagonista puede ser capaz de reducir los niveles de STAT-5 fosforilado cuando menos en un 20 por ciento, 50 por ciento, 75 por

ciento, 80 por ciento, 85 por ciento, 90 por ciento, 95 por ciento o 100 por ciento en comparación con los niveles de STAT-5 en ausencia del antagonista, o en comparación con un control negativo, o con células no tratadas. El antagonista puede tener un valor de CI_{50} de 50
5 microgramos/mililitro, 25 microgramos/mililitro o menos, 10 microgramos/mililitro o menos, 5 microgramos/mililitro o menos o 2 microgramos/mililitro o menos. En una modalidad, el antagonista tiene un valor de CI_{50} menor o igual a 1 microgramo/mililitro, menor o igual a 0.75
10 microgramos/mililitro, menor o igual a 0.5 microgramos/ mililitro, menor o igual a 0.25 microgramos/mililitro o menor o igual a 0.1 microgramos/mililitro.

Los antagonistas de la invención son particularmente eficaces para inhibir la expansión de linfocitos T_H17 . La expansión de linfocitos T_H17
15 puede determinarse en un ensayo de expansión de T_H17 , que comprende estimular la expansión de una población de linfocitos T vírgenes en presencia y ausencia de un agente de ensayo, seguido de la estimulación de las células para producir IL-17 y la evaluación del nivel de IL-17
20 producido por las células en presencia y en ausencia del agente de ensayo.

En un ensayo de ejemplo, los linfocitos T $CD4^+$ humanos se diferencian en T_H17 por estimulación con activación del receptor de linfocitos T en presencia de IL-1, IL-6 e IL-23. Después de 5 días de
25 diferenciación, las células $CCR6^+$ se clasifican para producir una población

de T_H17 enriquecida. Esta población después se estimula con IL-7 humana y se determina el aumento en IL-17 e IFN- γ en el sobrenadante. Puede determinarse la capacidad para un agente de ensayo, tal como un fragmento de enlace a antígeno de la presente invención, para bloquear la interacción entre la IL-7 y CD127, ya que la presencia de un antagonista de esta interacción durante el período de incubación prevendría la expansión de los linfocitos T_H17 llevando a la reducción de la producción de IL-17 e IFN- γ .

Las proteínas de enlace a antígeno de la invención pueden tener una inhibición del 20 por ciento o mayor de la secreción de IL-17 en dicho ensayo, frente a un control negativo. Más típicamente, la proteína de enlace a antígeno puede conseguir una inhibición del 50 por ciento, del 75 por ciento, del 85 por ciento o del 90 por ciento o mayor de la secreción de IL-17 frente al control. El fragmento de enlace a antígeno, en algunas modalidades, puede presentar un valor de CI₅₀ menor o igual a 50 microgramos/mililitro en el ensayo. En otras modalidades, el valor de CI₅₀ puede ser menor o igual a 20 microgramos/mililitro, 10 microgramos/mililitro o 5 microgramos/ mililitro.

De esta manera, en otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o trastorno inflamatorio, que comprende administrar a un paciente una proteína de enlace a antígeno de la invención en una cantidad suficiente para reducir el número de linfocitos T_H17 en el paciente.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un ser humano, que comprende administrar al sujeto una proteína de enlace a antígeno en una cantidad suficiente para reducir la fosforilación de STAT-5 mediada por el receptor de IL-7.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar la esclerosis múltiple en un paciente, que comprende administrar una proteína de enlace a antígeno de la invención al paciente, en el que el paciente padece esclerosis múltiple recidivante remitente.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmune o inflamatoria en un sujeto humano, que comprende administrar al sujeto una proteína de enlace a antígeno de la invención al paciente en una cantidad eficaz para reducir la relación de linfocitos T_H17 con respecto a linfocitos T_H1 .

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmune o inflamatoria en un sujeto humano, que comprende administrar al sujeto una proteína de enlace a antígeno de la invención al paciente en una cantidad eficaz para reducir la relación de linfocitos T_H con respecto a células T_{reg} (Foxp3+).

Procedimientos diagnósticos de uso

Las proteínas de enlace a antígeno descritas en el presente documento pueden usarse para detectar CD127 en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo* con fines de diagnóstico. Por ejemplo, las proteínas de

enlace a antígeno anti-CD127 pueden usarse para detectar CD127 en células cultivadas, en un tejido o en suero. El tejido puede haberse extraído primero (por ejemplo, de una biopsia) del cuerpo de un ser humano o un animal. Pueden emplearse inmunoensayos convencionales, incluyendo
5 ELISA, transferencia de Western, inmunohistoquímica o inmunoprecipitación.

Las proteínas de enlace a antígeno pueden proporcionarse en un kit de diagnóstico que comprende una o más proteínas de enlace a antígeno, un marcador detectable e instrucciones para uso del kit. Por conveniencia,
10 el kit puede comprender los reactivos en cantidades previamente determinadas con instrucciones para el uso.

Terapia génica

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de enlace a antígeno descritas en el presente documento pueden administrarse a un sujeto que lo necesita. La molécula de ácido nucleico puede expresar las CDR en un armazón o dominio apropiado, el dominio variable, o el anticuerpo de longitud completa. La molécula de ácido nucleico puede estar comprendida en un vector que permite la expresión
15 en una célula humana o animal. La molécula de ácido nucleico o el vector pueden formularse para administración con un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o uno o más agentes terapéuticamente activos como se ha analizado anteriormente.

Ejemplos

1.0 Humanización de 1A11

1.1 Clonación de 1A11 de las regiones variables de hibridoma

5 Se preparó ARN total a partir de un sedimento de células de los
hibridomas 1A11 y se realizó una RT-PCR para generar ADNc de las
regiones variables. Las regiones variables amplificadas para la cadena
pesada y ligera de cada hibridoma se clonaron en un vector de clonación
pCR2.1. Se obtuvo la secuencia para las regiones variables pesada y ligera
10 de cada hibridoma. El análisis de la secuencia predijo las secuencias
peptídicas siguientes (con las regiones determinantes de
complementariedad destacadas):

A) 1A11 VH

EVQLQQSGPELLKPGASKISKASGYSFT**GYTM**NWVKQSHGKNLEWIG
15 **LINPYNGVTSYNQKFKG**KATLTVAKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARG
DGNYWYFDVWGAGTTVTVSS

B) 1A11 VL

EIVLTQSPAITAASLGQKVTITC**SASSSVTYM**HWYQQKSGTSPKPWIYEIS
20 **KLASGVPVRFSGSGSGTSYSLT**ISSMEAEDAAIYYC**QEWNPYTF**GGGT
KLEIK

25 Se elaboró una forma quimérica recombinante del anticuerpo
fusionando las regiones variables pesada y ligera con regiones constantes

humanas de IgG1Fc y kappa respectivamente.

1.2 Estrategia de Humanización de Cadena Pesada de 1A11

5 Después de un análisis BLAST de las bases de datos de línea
germinal de gen V humano, se seleccionó la línea germinal humana
IGHV1_2 que tenía una identidad del 64 por ciento (incluyendo las CDR)
con la secuencia de cadena pesada variable de 1A11 de ratón como región
10 de marco aceptora preferida para la humanización. La región V de línea
germinal se combinó por simulación con ordenador con una FR4 adecuada,
en este caso el minigen JH6 (Kabat Vol. II) basándose en la similitud de
secuencias. Los primeros seis residuos del minigen JH6 que preceden al
motivo WGQG están dentro de la región CDR3 que se reemplaza por la
15 CDR entrante del anticuerpo donador. Se generaron ocho variantes de
cadena pesada humanizadas basándose en la comparación de secuencias
y el posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción H0 era
un injerto directo de CDR de ratón de 1A11 (usando la definición de Kabat)
en el marco aceptor humano seleccionado anteriormente. Las
20 construcciones H1 a H3 se basan en H0; cada una incorpora una mutación
marco adicional que era diferente en cada construcción; posiciones 71, 66
y 69 respectivamente. Las construcciones H4 a H7 incorporaran dos, tres,
cuatro o cinco de las retromutaciones anteriores.

25

1.3 Fundamento de la Humanización de Cadena Pesada de 1A11 para
IGHV1-2 de marco conservado

		1	11	21	CDR1	39	48
5	VH1A11	EVQLQQSGPE	LLKPGASMKI	SCKASGYSFT	GYTM..	MWVK	QSHGKNLEWI
	IGVH1-2	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	HWVR	QAPGQGLEWM
	1A11H0	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	MWVR	QAPGQGLEWM
	1A11H1	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	MWVR	QAPGQGLEWM
	1A11H2	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	MWVR	QAPGQGLEWM
10	1A11H3	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	MWVR	QAPGQGLEWM
	1A11H4	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	MWVR	QAPGQGLEWM
	1A11H5	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	MWVR	QAPGQGLEWM
	1A11H6	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	MWVR	QAPGQGLEWM
	1A11H7	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	GYTM..	MWVR	QAPGQGLEWM
15		49	CDR2	66	76	83	92
	VH1A11	GLINPY.. NG	VTSYNQKFKG	KATLTVAKSS	STAYMELLSL	TS	EDSAVYYC
	IGVH1-2	GWINPN.. SG	GTNYAQKFQG	RVTMTRDTSI	STAYMELSRL	RS	DDTAVYYC
	1A11H0	GLINPY.. NG	VTSYNQKFKG	RVTMTRDTSI	STAYMELSRL	RS	DDTAVYYC
	1A11H1	GLINPY.. NG	VTSYNQKFKG	RVTMTVDTSI	STAYMELSRL	RS	DDTAVYYC
20	1A11H2	GLINPY.. NG	VTSYNQKFKG	KVTMTRDTSI	STAYMELSRL	RS	DDTAVYYC
	1A11H3	GLINPY.. NG	VTSYNQKFKG	RVTLTTRDTSI	STAYMELSRL	RS	DDTAVYYC
	1A11H4	GLINPY.. NG	VTSYNQKFKG	KVTMTVDTSI	STAYMELSRL	RS	DDTAVYYC
	1A11H5	GLINPY.. NG	VTSYNQKFKG	KVTLTVDTSI	STAYMELSRL	RS	DDTAVYYC
	1A11H6	GLINPY.. NG	VTSYNQKFKG	KVTLTVDKSI	STAYMELSRL	RS	DDTAVYYC
25	1A11H7	GLINPY.. NG	VTSYNQKFKG	KVTLTVAKSI	STAYMELSRL	RS	DDTAVYYC

93 **CDR3** 104

VH1A11 **ARGD****GNY...** ...**WYFD**WG AGTTVTVSS

JH6 -- WG QGTTVTVSS

5 1A11H0 **ARGD****GNY...** ...**WYFD**WG QGTTVTVSS

1.4 Estrategia de Humanización de Cadena Ligera de 1A11

Después de un análisis BLAST de las bases de datos de línea germinal de gen V humano, se seleccionó la línea germinal humana IGKV3_11 que tenía una identidad del 53 por ciento (incluyendo las CDR) con la secuencia de cadena ligera variable de 1A11 de ratón como región de marco aceptora preferida para la humanización. La región V de línea germinal se combinó por simulación por ordenador con una FR4 adecuada, en este caso el minigen kappa 4 de región J (Kabat Vol. II) basándose en la similitud de secuencias. Los tres primeros residuos del minigen JK-4 caen dentro de la región CDR3 que se reemplaza por la CDR entrante del anticuerpo donador. Se generaron diez variantes de cadena ligera humanizada basándose en la comparación de secuencias y el posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción L0 era un injerto directo de CDR de ratón de 1A11 (usando la definición de Kabat) en el marco aceptor humano seleccionado anteriormente. Las construcciones L1, L2 y L4 se basan en L0, y cada una incorpora una mutación de marco adicional que era diferente en cada construcción; posiciones 47, 71 y 46

25

1A11L7 KPWIYEISKL ASGVPARFSG SGSGTDYTLT ISSLEPEDFA VYYCQEWNY

1A11L8 KPWIYEISKL ASGVPARFSG SGSGTSYTLT ISSLEPEDFA VYYCQEWNY

1A11L9 KPWIYEISKL ASGVPVRFSG SGSGTSYTLT ISSLEPEDFA VYYCQEWNY

5 95

Vk Vk1A11 .PYTFGGGT KLEIK

1A11L0 .PYTFGGGT KVEIK

hJk1 ----Q-- -V---

hJk2 Y---Q-- -----

10 hJk3 F---P-- -VD--

hJk4 L---G-- -V---

hJk5 I---Q-- R----

15 2.0 Humanización de 6A3

2.1 Estrategia de Humanización de Cadena Pesada de 6A3

 Después de un análisis BLAST de las bases de datos de línea germinal de gen V humano, se seleccionaron la línea germinal humana IGHV4_61 que tenía una identidad del 71 por ciento (incluyendo las CDR)

20 con la secuencia de cadena pesada variable de 6A3 de ratón y la línea germinal humana IGHV3_33 que tenía una identidad del 51 por ciento (que previamente se ha demostrado que se expresa bien con IGKV1_39) como regiones de marco aceptoras preferidas para la humanización. La región V

25 de línea germinal se combinó por simulación por ordenador con una FR4 adecuada, en este caso el minigen JH6 (Kabat Vol. II) basándose en la

similitud de secuencias. Los dos primeros residuos del minigen JH6 que preceden al motivo WGQG caen dentro de la región CDR3 que se reemplaza por la CDR entrante del anticuerpo donador. Se generaron diez variantes de cadena pesada humanizada con IGHV4_61 de marco y doce
5 variantes de cadena pesada humanizada con IGHV3_33 de marco basándose en la comparación de secuencias y el posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción H0 era un injerto directo de CDR de ratón de 6A3 (usando la definición de Kabat) en la región de marco
10 aceptora humana seleccionada anteriormente. Las construcciones H1 a H5 con IGHV4_61 de marco se basan en H0, cada una incorpora una mutación de marco adicional que era diferente en cada construcción; posiciones 71, 27, 30, 67 y 48 respectivamente. Las construcciones H6 a H9 incorporan dos, tres, cuatro o cinco de las retromutaciones anteriores.
15 Las construcciones H1 a H11 con IGHV3-33 de marco se basan en H0, cada una incorpora una mutación de marco adicional que era diferente en cada construcción; posiciones 27, 30, 28, 29, 67, 73, 78, 49, 68, 24 y 48 respectivamente.

20 2.2 Fundamento de Humanización de Cadena Pesada de 6A3 para IGHV4_61 de marco conservado

	1	11	21	CDR1	39	48
25	VH6A3	DVQLQESGPG	LVKPSQSLSL	TCTVTGYSIT	TDYAW.NWIR	QFPGNKLEWM

IGHV4_61 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **SGGYWS**WIR QPPGKGLEWI
6A3-H0 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWI
6A3-H1 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWI
6A3-H2 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVS **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWI
5 6A3-H3 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVI **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWI
6A3-H4 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWI
6A3-H5 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSVS **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWM
6A3-H6 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVS **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWI
6A3-H7 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVI **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWI
6A3-H8 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVI **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWI
10 6A3-H9 QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGYSVI **TDYAW.MWIR** QPPGKGLEWM

49 **CDR2** 66 76 83 92
VH6A3 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RISITRDISK NQFFLQLNSV TTEDTATYYC
IGHV4_61 GYIYY...**SG STNYNPSLKS** RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
15 6A3-H0 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
6A3-H1 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RVTISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
6A3-H2 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
6A3-H3 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
6A3-H4 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RITISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
6A3-H5 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RVTISVDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
20 6A3-H6 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RVTISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
6A3-H7 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RVTISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
6A3-H8 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RITISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC
6A3-H9 GYIFY...**SG STTYTPSLKS** RITISRDTSK NQFSLKLSSV TAADTAVYYC

93 **CDR3** 104

VH6A3 ARGGYDVNYF.... ...**DYW** GQGTTLTVSS

IGHV4_61 AR

6A3 H0-H9 ARGGYDVNYF.... ...**DYW** GQGTTVTVSS

5

Marco 4

93 **CDR3** 104

VH6A3 AGGLAGTL.....**DYW** GQGTTLTVSS

IGHV4_61 AR

10

hJH1 FQH- ----LV----

hJH2 FDL- -R--LV----

hJH3 FDV- ----MV----

hJH4 ---- ----LV----

hJH5 FDS- ----LV----

15

hJH6 MDV- ----V----

6A3H0-9 AGGLAGTL.....**DYW** GQGTTVTVSS

2.3 Fundamento de Humanización de Cadena Pesada de 6A3 para

IGHV3_33 de marco conservado

20

1 11 21 **CDR1** 39 48

VH6A3 DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT **TDYAW.MWIR** QFPGNKLEWM

IGHV3_33 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **SYGMH..WVR** QAPGKGLEWV

25

6A3-H0 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV

6A3-H1 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGYTFS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV

6A3-H2 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFI **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV
6A3-H3 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFSS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV
6A3-H4 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTIS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV
6A3-H5 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV
5 6A3-H6 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV
6A3-H7 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV
6A3-H8 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV
6A3-H9 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV
6A3-H10 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAVSGFTFS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWV
6A3-H11 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS **TDYAW.MWVR** QAPGKGLEWM

10

49 **CDR2** 66 76 83 92

VH6A3 GYIFY...SG STTYTPSLKS RISITRDISK NQEFLQLNSV TTEDTATYYC
IGHV3_33 AVIWY...DGSNKYYADSVKG RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H0 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
15 6A3-H1 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H2 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H3 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H4 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H5 AYIFY...SG STTYTPSLKS RITISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H6 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDISK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
20 6A3-H7 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDN SK NTEYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H8 GYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H9 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFSISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H10 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC
6A3-H11 AYIFY...SG STTYTPSLKS RFTISRDN SK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC

25

93 **CDR3** 104

VH6A3 ARGGYDVNYF.... ...DYW GQGTTTLTVSS
IGHV3_33 AR
6A3 H0-H9 ARGGYDVNYF.... ...DYW GQGTTVTVSS

5

Marco 4

93 **CDR3** 104

VH6A3 AGGLAGTL.....DYW GQGTTTLTVSS
IGHV3_33 AR

10

hJH1 FQH- ----LV----
hJH2 FDL- -R--LV----
hJH3 FDV- ----MV----
hJH4 ---- ----LV----
hJH5 FDS- ----LV----
15 hJH6 MDV- ----V----

6A3H0-11 AGGLAGTL.....DYW GQGTTVTVSS

2.4 Estrategia de Humanización de Cadena Ligera de 6A3

20

Después de un análisis BLAST de las bases de datos de línea germinal del gen V humano, se seleccionó la línea germinal humana IGKV1_39 que tenía una identidad del 72 por ciento (incluyendo las CDR) con la secuencia de cadena ligera variable de 6A3 de ratón como región de marco aceptora preferida para la humanización. La región V de línea germinal se combinó por simulación por ordenador con una FR4 adecuada, 25 en este caso el minigen kappa 2 de región J (Kabat Vol. II) basándose en la

similitud de secuencias. Los dos primeros residuos del minigen JK-2 caen dentro de la región CDR3 y son idénticos a los últimos dos residuos en la CDR3 de la cadena ligera de 6A3 de ratón. Se generaron cinco variantes de cadena ligera humanizadas basándose en la comparación de secuencias y el posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción L0 era un injerto directo de CDR de ratón de 6A3 (usando la definición Kabat) en la región de marco aceptora humana seleccionada anteriormente. Las construcciones L1, L2 se basan en L0, cada una incorpora una mutación de marco adicional que era diferente en cada construcción; posiciones 45, 70 respectivamente. La construcción L3 incorpora las dos retromutaciones anteriores.

Fundamento de Humanización de Cadena Ligera de 6A3 para IGKV1 39 de marco

15	1	CDR1	44
	Vk 6A3	DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKSP	
	IGKV1_39	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP	
	6A3 L0	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP	
20	6A3 L1	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP	
	6A3 L2	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP	
	6A3 L3	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQ... ..TIGAWLA WYQQKPGKAP	
	45	CDR2	CDR3 94
	Vk 6A3	QLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTKFSFK ISSLQAEDFV SYYCQQFFST	
25	IGKV1_39	KLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISSLPEDFA TYYCQQFFST	
	6A3 L0	KLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISSLPEDFA VYYCQQFFST	

6A3 L1 QLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTDFTLT ISSLQPEDFA VYYCQQFFST
6A3 L2 KLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTKFTLT ISSLQPEDFA VYYCQQFFST
6A3 L3 QLLIYAATRL ADGVPSRFSG SGSGTKFTLT ISSLQPEDFA VYYCQQFFST

5

95

Vk 6A3 P..WTEGGGT KLEIKR
6A3 L0-L3 P..WTEGQGT KLEIKR

Marco 4

10

hJk2 FGQGT KLEIKR

15

20

Se generaron cinco variantes de cadena ligera humanizada basándose en la comparación de secuencias y el posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción L0 era un injerto directo de CDR de ratón de 6A3 (usando la definición de Kabat) en la región de marco aceptora humana seleccionada anteriormente. Las construcciones L1, L2 se basan en L0, cada una incorpora una mutación de marco adicional que era diferente en cada construcción; posiciones 45, 70 respectivamente. La construcción L3 incorpora las dos retromutaciones anteriores; la construcción L27 incorpora más mutaciones e incluye T4L, A31Y, D70M, V85T, T94Y, Q100G, L104V (SEQ ID N°: 138).

TABLA 3: Variantes humanizadas de cadena ligera variable de 6A3

25

5

10

15

VL Humanizada	Plantilla	Retromutaciones (Nº Kabat)
L0	Injerto directo de CDR de 6A3VLCDR en IGKV1-39 + minigen JK-2	Ninguna
L1	L0	K45Q
L2	L0	D70K
L3	L1	K45Q, D70K
L27	L0	T4L, A31Y, D70M, V85T, T94Y, Q100G, L104V

2.5 Construcción de Cadena Pesada Variable con Fc Inactivado

20

25

Se realizaron dos sustituciones de aminoácidos, L237A y G239A, en la construcción 1A11 H3. Estas modificaciones hacen que la molécula sea menos capaz de reclutar células efectoras inmunes o el complemento. La construcción de VH resultante se identifica como 1A11 VH3-Fc-DA, y tiene una secuencia como la mostrada en la SEQ ID Nº: 119. El anticuerpo que comprendía 1A11VH3-Fc-DA y la cadena ligera de 1A11.H4 (1A11 H3L4Fc) se analizó adicionalmente como se describe en el Ejemplo 4

proporcionado a continuación.

2.6 Maduración de Afinidad de 1A11 H3L4

2.6.1 Construcción de variantes anti-IL7R 1A11 H3L4 CDRH3 recombinantes

5 Se produjeron varias variantes del anticuerpo monoclonal anti-IL7R humanizado 1A11 H3L4. Todos ellos diferían únicamente en una sustitución de aminoácido en la región CDRH3 de la cadena pesada del anticuerpo que tenía la secuencia de aminoácidos de cadena pesada
10 expuesta en la SEQ ID N°: 115 (H3) y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera expuesta en la SEQ ID N°: 116 (L4).

 Se generaron variantes de CDRH3 humanizadas de 1A11 H3L4 dentro del vector de expresión mamíferos pLEFD usando mutagénesis dirigida al sitio.

15 2.6.2 Expresión de anticuerpo a pequeña escala en células HEK 293 6E

 Se introdujeron de forma transitoria por co-transfección plásmidos pLEFN y pLEFD que codificaban las cadenas ligera y pesada de 1A11 H3L4 y variantes de CDRH3 respectivamente en células HEK 293 6E a una
20 escala de 96 pocillos (volumen de expresión de 500 µl) usando 293fectin (Invitrogen, 12347019). Los sobrenadantes se recogieron por centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm. Los sobrenadantes que
 contenían anticuerpo después se filtraron usando una placa de filtración de 0.45 µm. Los anticuerpos se evaluaron directamente en el sobrenadante de
25 cultivo de tejidos.

2.6.3 Análisis Proteon de variantes de CDRH3 anti-IL7R 1A11 H3L4

La exploración inicial para determinar la afinidad de enlace de las variantes de anticuerpo de CDRH3 (que procedían de expresiones de anticuerpo a pequeña escala en las células HEK 293 6E y evaluadas directamente en el sobrenadante de cultivo de tejidos, como se describe en el Ejemplo 2.6.2) se realizó en el Proteon XPR36 (Biorad). El procedimiento fue el siguiente; se inmovilizó proteína A en la microplaca de GLC por acoplamiento de amina primaria, después se capturaron anticuerpos mutantes de CDRH3 en esta superficie y se pasó IL7R por encima a 256, 64, 16, 4 y 1 nM, usándose una inyección 0 nM (es decir, tampón solo) para obtener una doble referencia para las curvas de enlace. Se usó NaOH 50 mM para regenerar la superficie de captura, retirando los anticuerpos mutantes de CDRH3 unidos y dejando lista la superficie para otro ciclo de captura e inyección de analito. Los datos se ajustaron al modelo 1:1 usando el software de análisis intrínseco en la máquina. El análisis de enlace para los anticuerpos mutantes se realizó directamente a partir de los sobrenadantes de cultivo de tejidos.

La exploración identificó varios anticuerpos que parecían tener mejores perfiles cinéticos que la molécula parental (1A11 H3L4). Los datos obtenidos a partir de este análisis se muestran en 4.2.3, demostrando que varias mutaciones de CDRH3 en los residuos N98 y F100b parecían mejorar la afinidad de enlace a IL7R. A partir de esta serie de datos, se seleccionaron seis moléculas para un análisis adicional (Ejemplo 2.6.4).

2.6.4 Expresión de anticuerpos a mayor escala en células HEK 293 6E

Los datos destacaron que varias mutaciones de CDRH3 en los residuos N98 y F100b parecían mejorar la afinidad de enlace a IL7R (datos mostrados en 4.4.3). Por lo tanto, se produjo anticuerpo purificado para estas seis variantes de CDRH3. Se subclonaron construcciones que codificaban la cadena pesada y ligera de variantes de CDRH3 1A11 H3L4 a partir de los plásmidos pLEFD y pLEFN en el vector pTT para una expresión óptima a gran escala en HEK 293 6E. Los plásmidos se introdujeron por co-transfección transitoriamente en 50-100 mililitros de HEK 293 6E (los detalles de los plásmidos se resumen en la Tabla 7) usando 293fectin (Invitrogen, 12347019). Se añadió alimentación con triptona al cultivo celular después de 24 horas y las células se recogieron después de 72 horas más. Después, el anticuerpo se purificó por afinidad usando columnas con Proteína A inmovilizada y se cuantificó leyendo la absorbancia a 280 nanómetros.

3.0 Construcción de vectores humanizados

Las secuencias de ADN de las regiones variables humanizadas se secuenciaron de forma optimizada usando el software LETO 1.0 (Entelechon GmbH) y se sintetizaron de *novo* por construcción de oligonucleótidos solapantes y amplificación por PCR. Los cebadores incluían sitios de restricción para clonación en vectores de expresión de mamífero y secuencias de señales de inmunoglobulina humana para la secreción. Las regiones pesadas variables humanizadas se clonaron en

vectores de expresión de mamífero que contenían la región constante gamma 1 humana usando Age1/Kas1. En paralelo, las regiones ligeras variables humanizadas se clonaron en vectores de expresión de mamífero que contenían la región constante kappa humana usando HindIII y BsiWI.

5

4.0 Caracterización de anticuerpos humanizados

4.1 Determinación de cinética de enlace de construcciones 1A11 y 6A3: BIAcore^{MR}3000

La cinética de enlace de los anticuerpos anti-CD127 para CD127 ECD humano se evaluó usando un dispositivo BIAcore 3000 (GE Healthcare). Las construcciones 6A3 o 1A11 humanizadas se capturaron en una microplaca biosensora CM5 que ya tenía un anticuerpo monoclonal anti-IgG humana (específico de Fc) BIAcore inmovilizado (GE Healthcare N° de cat BR-1008-39) usando el tampón de acoplamiento suministrado. Se inyectó una serie de concentraciones de CD127 ECD humana (512, 256, 128, 64, 32, 16 nM) durante 240 segundos a un caudal de 30 microlitros/minuto.

15

20

- 1) Captura del MAb de interés
- 2) Asociación de analito a MAb capturado
- 3) Disociación de analito (tampón)
- 4) Regeneración con tampón optimizado para BIAcore. Retirada de todos excepto el Ac anti-H acoplado covalentemente. Ciclos de proceso cinético de BIAcore: tampón, 512, 256, 128, 64, 32, 16 nM.

25

IL7R ECD; ciclo de tampón usado para obtener una doble referencia.

Las superficies de anticuerpo se regeneraron con MgCl_2 3 M. Las cinéticas se determinaron por ajuste global de los datos al modelo Langmuir 1:1 usando el software BIAevaluation. Los resultados se muestran en el Ejemplo 4.2.1 (1A11) y 4.2.2 (6A3).

5 4.1.1 Determinación de cinética de enlace de variantes de CDRH3 1A11
H3L4 seleccionadas

Se usó el análisis BIAcore^{MR} para determinar la afinidad de enlace de los anticuerpos mutantes de CDRH3 purificados (que se obtuvieron a partir de expresiones de anticuerpo a mayor escala en las células HEK 293 6E, como se describe en el Ejemplo 2.6.4).

10 4.1.1.1 Procedimiento 1: BIAcore^{MR} T100

Se inmovilizó una IgG anti-humana (GE Healthcare/BIAcore^{MR} BR-1008-39) en una microplaca CM3 por acoplamiento de amina primaria a un nivel de aproximadamente 1.300 unidades de resonancia (UR), después se capturaron anticuerpos mutantes de CDRH3 en dicha placa, todos los anticuerpos se capturaron a un nivel similar (44-56 UR) y se pasó IL-7R por encima a 256, 64, 16, 4, 1 nM, usándose una inyección 0 nM (es decir tampón solo) para obtener una doble referencia para las curvas de enlace, y la regeneración de esta superficie se consiguió usando MgCl_2 3 M. Los datos de enlace se ajustaron al modelo 1:1 intrínseco al software de análisis BIAcore^{MR} T100. El ensayo se realizó usando HBS-EP como tampón de procesamiento y se realizó a 25°C en el BIAcore^{MR} T100. Los resultados se muestran en 4.2.4.

4.1.1.2: Procedimiento 2: BIAcore^{MR} 3000

Se inmovilizó una IgG anti-humana (GE Healthcare/BIAcore^{MR} BR-1008-39) en una microplaca CM5 por acoplamiento de amina primaria a un nivel de ~ 5.400 unidades de resonancia (UR), después se capturaron anticuerpos mutantes de CDRH3 en esta superficie, todos los anticuerpos se capturaron a un nivel similar (175-205 UR) y se pasó IL-7R por encima a 64, 16, 4, 1 nM, usándose una inyección 0 nM (es decir tampón solo) para obtener una doble referencia para las curvas de enlace, y la regeneración de esta superficie se consiguió usando MgCl_2 3 M. Los datos de enlace se ajustaron al modelo 1:1 intrínseco al software de análisis BIAcore^{MR} 3000. El ensayo se realizó usando HBS-EP como tampón de procesamiento y se realizó a 25°C en el BIAcore^{MR} 3000. Los resultados se muestran en 4.2.5.

4.1.2 Determinación de reactividad cruzada de especies 1A11 H3L4 en mono cinomolgo y tití

Se evaluó la cinética de enlace de 1A11H3L4 para CD127 ECD de mono cinomolgo y tití usando un Biacore 3000. Se capturó 1A11H3L4 en una microplaca biosensora CM5 que ya tenía anticuerpo monoclonal anti-IgG humana (específico de Fc) BIAcore (GE Healthcare N° cat BR-1008-39) inmovilizado. Las superficies de anticuerpo se regeneraron con MgCl_2 3 M. La cinética se determinó por ajuste global de los datos al modelo Langmuir 1:1 usando el software BIAevaluation. Los resultados se muestran en el apartado 4.3.

4.1.3 Ensayo de inhibición del receptor de IL7

También se usó el análisis BIAcore^{MR} para demostrar que los anticuerpos mutantes de CDRH3 purificados (que procedían de expresiones de anticuerpo a mayor escala en células HEK 293 6E, como se describe en el Ejemplo 2.6.4) podían inhibir la interacción entre IL7 e IL7R.

Se inmovilizó IL7 (R&D Systems) en una microplaca CM5 por acoplamiento de amina primaria; la superficie se acondicionó con glicina 10 mM, pH 3,0 para proporcionar una superficie estable para el ensayo de neutralización. Se incubó IL7R a 64 nM con los anticuerpos de ensayo a concentraciones de 256 nM, 128 nM, 64 nM, 16 nM, 8 nM, 4 nM, 2 nM y 1 nM en el ensayo 1 y de 256 nM, 128 nM, 64 nM, 16 nM, 8 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, 0.5 nM y 0.25 nM en el ensayo 2. Después, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas antes de procesarse sobre la microplaca IL7/CM5, y se usó glicina 10 mM, pH 3,0, para regenerar la superficie para la siguiente interacción. Los valores de CI_{50} se calcularon usando Robosage, con lo que las señales de enlace se convirtieron en valores en porcentaje basándose en la señal máxima conseguida usando IL7R a 64 nM con anticuerpo 0 nM. Los resultados se muestran en el apartado 4.7.

4.2 Resultados de cinética de enlace

4.2.1 1A11

TABLA 4: Cinética de enlace para construcciones de 1A11

5

10

15

20

25

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Quimera de 1A11	9,26e4	2,98e-4	3,22e-9
1A11 H0L0	Sin observar enlace	-	-
1A11 H1L1	Sin observar enlace	-	-
1A11 H6L6	Sin observar enlace	-	-
1A11 H7L5	Sin observar expresión	-	-
1A11 H3L4	1,77e5	4,64e-4	2,62e-9
1A11 H3L5	2,94e4	6,07e-3	2,07e-7
1A11 H3L9	4,32e4	1,84e-3	4,25e-8
1A11 H3L6	1,82e4	2,82e-3	1,55e-7
1A11 H4L4	Sin observar enlace	-	-

5

10

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1A11 H6L4	Sin observar enlace	-	-
1A11 H7L4	Sin observar expresión	-	-
1A11 H3L4 marcado con biotina	1,69e5	4,52e-4	2,67e-9
1A11 H3L4Fc	1,8e5	6,62e-4	3,68e-9

4.2.2 6A3

TABLA 5: Cinética de enlace para construcciones de 6A3

15

20

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
H4-61_6L27	1,6e4	2,99e-4	19
H4-61_7L27	3,77e4	1,04e-3	28
H4-61_8L27	2,43e4	3,7e-4	15
H4-61_9L27	6,99e4	1,22e-3	18

4.2.3 Selección de diversas variantes de CDRH3 anti-IL7R 1A11 H3L4 de 1A11 H3L4 por análisis BIAcore^{MR}

25

TABLA 6 - Análisis Proteon de variantes de CDRH3 anti-IL-7R 1A11 H3L4 (kD, en nM)

	CDRH3									
Posiciones de aminoácidos dentro de 1A11 H3L4 CDRH3	G95	D96	G97	N98	Y99	W100	Y100a	F100b	D101	V102
Ala	0,30	14,60	0,18	0,23	0,21	5,75	0,20	0,17	0,76	0,13
Cys	1,16	1,97	1,34	0,24	2,74	40,90	0,32	0,06	0,94	0,15
Asp	2,48	Paren-tal	0,35	0,03	0,39	Mal enlace	0,26	0,08	Paren-tal	0,10

5

10

15

20

	CDRH3									
Posiciones de aminoácidos dentro de 1A11 H3L4 CDRH3	G95	D96	G97	N98	Y99	W100	Y100a	F100b	D101	V102
Glu	2,06	0,16	2,28	0,05	0,39	Mal enlace	0,88	0,04	0,44	0,10
Phe	2,18	19,20	1,51	0,48	0,15	9,61	0,48	Parental	1,25	0,10
Gly	Parental	30,40	Parental	0,18	0,52	11,50	0,89	0,24	1,00	0,10

177

5

10

15

20

	CDRH3									
Posiciones de aminoácidos dentro de 1A11 H3L4 CDRH3	G95	D96	G97	N98	Y99	W100	Y100a	F100b	D101	V102
His	0,63	3,05	1,66	0,24	0,41	12,20	0,23	0,06	0,85	0,18
Iso		4,73	0,21	0,37	0,93	Mal enlace	0,20	0,06	0,71	0,09
Lys		25,70	2,27		4,64	7,97	2,34	0,07	1,24	0,25
Leu		2,14	2,67		2,42	3,38	0,44	0,15	0,92	0,33
Met	0,82	7,81	2,26	0,27	1,70	10,60	0,17	0,06	0,89	0,08

178

	CDRH3									
Posiciones de aminoácidos dentro de 1A11 H3L4 CDRH3	G95	D96	G97	N98	Y99	W100	Y100a	F100b	D101	V102
Asn	2,44	0,46	0,43	Parental	1,50	10,90	0,09	0,14	0,41	0,14
Pro	6,92	6,84	0,19	5,38	6,90	Mal enlace	1,24	0,90	0,26	0,71
Gln	3,02	1,21	2,07	0,30	1,31	12,80	0,68	0,07	0,74	0,25
Arg	29,50	15,70	2,06	Sin enlace	3,26	Mal enlace	2,55	3,49	0,95	0,31

179

	CDRH3									
Posiciones de aminoácidos dentro de 1A11 H3L4 CDRH3	G95	D96	G97	N98	Y99	W100	Y100a	F100b	D101	V102
Ser	0,79	3,76	0,53	0,10	0,25	10,40	0,46	0,10	0,60	0,08
Thr	3,29	2,32	0,28	0,10	1,11	Mal enlace	0,31	0,14	0,49	0,10
Val	2,36	3,72	0,08		1,65	Mal enlace	0,17	0,05	0,59	Parental
Trp		15,80	4,96	0,52	0,31	Paren-	1,73	0,44	1,50	0,07

5

10

15

20

180

5

	CDRH3									
Posiciones de aminoácidos dentro de 1A11 H3L4 CDRH3	G95	D96	G97	N98	Y99	W100	Y100a	F100b	D101	V102
						tal				
Tyr		21,90	1,31	0,71	Parental	8,67	Parental	0,26	1,18	Sin enlace

10

15



Variantes de CDRH3 con mejor afinidad de enlace para IL7R

20

181

5

	CDRH3									
Posiciones de aminoácidos dentro de 1A11 H3L4 CDRH3	G95	D96	G97	N98	Y99	W100	Y100a	F100b	D101	V102

10



No presente

182

Valor de KD Representativo para 1A11 H3L4 = 0.166 nM

15

20

TABLA 7: mAb variantes de CDRH3 seleccionados contruidos y expresados

5	Anti- cuerpo ID	Nombres Alternati- vos	Lote Nº	Descripción de la Molécula	SEQ ID Nº de ADN	SEQ ID Nº de Proteína
10	BPC4398	1A11 H3L4 N98D (variante de CDRH3)	HEK 1023	Cadena H: Anti- IL7R 1A11 VH3 N98D humano	120	121
				Cadena L: Anti- IL7R 1A11 VL4 humano	108	22
15	BPC4399	1A11 H3L4 N98E (variante de CDRH3)	HEK 1024	Cadena H: Anti- IL7R 1A11 VH3 N98E humano	122	123
20				Cadena L: Anti- IL7R 1A11 VL4 humano	108	22
25	BPC4400	1A11 H3L4 F100bE (variante de	HEK 1025	Cadena H: Anti- IL7R 1A11 VH3 F100bE humano	124	125

5

10

15

20

25

Anti-cuerpo ID	Nombres Alternativos	Lote N°	Descripción de la Molécula	SEQ ID N° de ADN	SEQ ID N° de Proteína
	CDRH3)		Cadena L: Anti-IL7R 1A11 VL4 humano	108	22
BPC4401	1A11 H3L4 F100bH (variante de CDRH3)	HEK 1026	Cadena H: Anti-IL7R 1A11 VH3 F100bH humano	126	127
			Cadena L: Anti-IL7R 1A11 VL4 humano	108	22
BPC4402	1A11 H3L4 F100bI (variante de CDRH3)	HEK 1027	Cadena H: Anti-IL7R 1A11 VH3 F100bI humano	128	129
			Cadena L: Anti-IL7R 1A11 VL4 humano	108	22
BPC4403	1A11 H3L4 F100bV	HEK 1028	Cadena H: Anti-IL7R 1A11 VH3	130	131

IL7R 1A11 VH3

5

10

15

Anti-cuerpo ID	Nombres Alternativos	Lote N°	Descripción de la Molécula	SEQ ID N° de ADN	SEQ ID N° de Proteína
	(variante de CDRH3)		F100bV humano		
			Cadena L: Anti-IL7R 1A11 VL4 humano	108	22
BPC1142	1A11 H3L4	HEK 1029	Cadena H: Anti-IL7R 1A11 VH3 humano	13	32
		GRIT S379 88	Cadena L: Anti-IL7R 1A11 VL4 humano	108	22

20

4.2.4 Análisis BIAcore^{MR} T100 de variantes de CDRH3 1A11 H3L4 seleccionadas

25

La Tabla 8 muestra los datos obtenidos a partir del estudio 4.1.1.1, que muestra que todas las mutaciones de CDRH3 parecían tener mejores afinidades que las moléculas parentales, pareciendo ser la mejor construcción BPC4398 (Anti-IL7R 1A11 H3L4 N98D).

TABLA 8:

5

10

15

20

25

Identificador / Número de Molécula	Descripción de la Molécula	ka (M/s)	Kd (1/s)	KD (nM)
BPC1142(GRITS3 7988) Réplica 1	Anti-IL7R 1A11 H3L4	1,08E+06	7,06E-05	0,065
BPC1142(GRITS3 7988) Réplica 2	Anti-IL7R 1A11 H3L4	1,12E+06	5,86E-05	0,052
BPC4398	Anti-IL7R 1A11 H3L4 N98D (variante de CDRH3)	1,71E+06	3,70E-05	0,022
BPC4399	Anti-IL7R 1A11 H3L4 N98E (variante de CDRH3)	1,45E+06	4,08E-05	0,028
BPC4400	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bE (variante de CDRH3)	9,24E+05	2,68E-05	0,029
BPC4401	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bH (variante de CDRH3)	9,10E+05	3,06E-05	0,034

5

10

15

20

Identificador / Número de Molécula	Descripción de la Molécula	ka (M/s)	Kd (1/s)	KD (nM)
BPC4402	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bl (variante de CDRH3)	8,26E+05	3,32E-05	0,040
BPC4403	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bV (variante de CDRH3)	8,47E+05	3,30E-05	0,039
BPC1142 (HEK1029)	Anti-IL7R 1A11 H3L4	1,16E+06	6,48E-05	0,056
La molécula parental (BPC1142-anti-IL7R 1A11 H3L4) se procesó múltiples veces dentro del experimento usando material expresado en CHO (GRITS37988)) y material expresado en HEK (HEK1029), no se observaron diferencias significativas entre las afinidades para los diferentes sistemas de expresión para la molécula parental.				

4.2.5 Análisis BIAcore^{MR} 3000 de variantes de CDHR3 1A11 H3L4 seleccionadas

25

La Tabla 9 muestra los datos obtenidos a partir del estudio 4.1.1.2 y muestra que todas las mutaciones de CDRH3 parecían tener mejores afinidades que las moléculas parentales, pareciendo ser las mejores

construcciones BPC4398 (1A11 H3L4 N98D) y BPC4399 (1A11 H3L4 N98E).

TABLA 9:

5

10

15

20

25

Identificador / Número de Molécula	Descripción de la Molécula	ka (M/s)	Kd (1/s)	KD (nM)
BPC1142(GRITS37 988) Réplica 1	Anti-IL7R 1A11 H3L4	3,60E+05	2,70E-04	0,751
BPC1142(GRITS37 988) Réplica 2	Anti-IL7R 1A11 H3L4	3,62E+05	2,36E-04	0,651
BPC4398	Anti-IL7R 1A11 H3L4 N98D (variante de CDRH3)	5,44E+05	2,09E-04	0,385
BPC4399	Anti-IL7R 1A11 H3L4 N98E (variante de CDRH3)	5,97E+05	2,33E-04	0,39

5

10

15

20

25

Identificador / Número de Molécula	Descripción de la Molécula	ka (M/s)	Kd (1/s)	KD (nM)
BPC4400	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bE (variante de CDRH3)	3,51E+05	1,91E-04	0,546
BPC4401	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bH (variante de CDRH3)	3,37E+05	1,96E-04	0,582
BPC4402	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bI (variante de CDRH3)	3,00E+05	2,00E-04	0,668
BPC4403	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bV (variante de CDRH3)	2,98E+05	1,89E-04	0,636

5

10

15

20

25

Identificador / Número de Molécula	Descripción de la Molécula	ka (M/s)	Kd (1/s)	KD (nM)
BPC1142 (HEK1029)	Anti-IL7R 1A11 H3L4	3,49E+05	2,29E-04	0,656
La molécula parental (BPC1142-anti-IL7R 1A11 H3L4) se procesó múltiples veces dentro del experimento usando material expresado en CHO (GRITS37988) y material expresado en HEK (HEK1029), no se observó ninguna diferencia significativa entre las afinidades para los diferentes sistemas de expresión para la molécula parental.				

Se observaron diferencias en las afinidades globales calculadas entre los dos procedimientos. Probablemente esto se debe al hecho de que IL7R es un homodímero y por lo tanto la cantidad de avidéz y entrecruzamiento de los anticuerpos con el antígeno puede aumentar o disminuir dependiendo de las diferentes densidades de IL7R inmovilizado por las diferentes superficies de captura usadas en los dos ensayos. A pesar de las diferentes afinidades observadas entre los dos ensayos, la clasificación en los dos experimentos muestra que BPC4398 (1A11 H3L4 N98D) tenía mejor afinidad que la molécula parental 1A11 H3L4.

4.3 Reactividad cruzada de especies

Se observó que 1A11 H3L4 (natural) reaccionaba de forma cruzada con IL-7R de tití y de mono cinomolgo ensayado a un nivel comparable por el sistema Biacore (Tabla 10).

5 TABLA 10: Comparación de 1A11 H3L4 con IL7R Humano, IL7R de Ratón e IL7R de Mono Cinomolgo

	Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
10	1A11 H3L4 con IL7R humano	1,77e5	4,64e-4	2,62e-9
	1A11 H3L4 con IL7R de mono cinomolgo	2,58e4	2,34e-4	9,06e-9
15	1A11 H3L4 con IL7R de tití	4,93e4	2,99e-4	6,05e-9

20 4.4 Enlace a epítopo mediante cristalografía de rayos X

Usando un Fab 1A11 H3L4, se usó cristalografía de rayos X acoplada con modelado por simulación con ordenador para predecir las interfaces de enlace para los mAb para ayudar a proporcionar una perspectiva mecánica sobre la neutralización funcional observada, y para 25 realizar elecciones racionales para la maduración de anticuerpos.

Se estableció una estructura de alta resolución (2.08Å) de complejo de Fab 1A11H3L4/receptor de IL7 humano. El dominio extracelular del receptor de IL7 humano y 1A11H3L4 se expresaron en células CHO lec y se purificaron por cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión molecular. El fragmento Fab de 1A11H3L4 se generó por escisión con papaína. El complejo Fab1A11H3L4/IL7R ECD se generó mezclando una relación molar 1:1,2 de Fab1A11H3L4 con el receptor de IL7 ECD. Las proteínas se concentraron y cristalizaron usando el procedimiento de difusión de vapor por gota colgante. Los datos de difracción de rayos X se recogieron en el Advanced Photon Source en el Laboratorio Nacional Argonne. Los datos de difracción se indexaron y se aumentaron de escala usando el software HKL2000. La estructura se determinó por reemplazo molecular en el programa X-PLOR. La solución de reemplazo molecular inicial se sometió a múltiples vueltas de refinamiento por dinamismo molecular en CNX y reconstrucción con el programa WinCoot.

Basándose en la estructura cristalina 2,08Å de alta resolución, se predice que 1A11H3L4 se enlaza al receptor de IL7 en 4 de los bucles extracelulares de IL-7R, bloqueando de esta manera la enlace al ligando IL7:

- Bucle 2: 55Gly 56Ala 57Leu 58Val 59Glu 60Val 61Lys
- Bucle 3: 80Leu 81Leu 82Ile 83Gly 84Lys 100Lys
- Bucle 4: 138Lys 139Tyr 142Val
- Bucle 5: 192Tyr 193Phe

Estos descubrimientos son coherentes con la competición observada para la enlace a hIL7 que se observó entre 1A11 y 6A3.

4.5 Análisis de funciones efectoras

4.5.1 1A11 H3L4 carece de citotoxicidad mediada por el complemento

Un total de seis experimentos distintos mostraron que 1A11 H3L4 (tipo silvestre) no tenía ninguna citotoxicidad mediada por el complemento medible. Estos experimentos se realizaron con una línea celular HEK 293 MSR II transducida con hIL-7r BacMam, usada como diana. Estas células se transdujeron (mdí 75) durante ~ 21 horas a 37°C, con un 5 por ciento de CO₂ en matraces de cultivo T175. Después, las células adherentes se retiraron de los matraces usando TrypLE y se lavaron varias veces antes del cultivo en placas a 1x10⁵ células/50 microlitros/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 25 microlitros de anticuerpo durante 30 minutos a 37°C con un 5 por ciento de CO₂. Después de esta incubación, se añadieron 20 microlitros de complemento de conejo a la placa y después se devolvió al incubador durante 2 horas. Se realizó una evaluación de la viabilidad celular añadiendo 100 microlitros de CellTiter-Glo a cada pocillo con mezcla suave usando una pipeta multicanal. Después, la placa se leyó con respecto a la señal de luminiscencia en un lector de placas Victor V (las células viables tienen mayor señal). En la Figura 1 se muestra un ejemplo de uno de estos experimentos.

El anticuerpo de control positivo (Grits 32092) usado en el

experimento anterior era específico hacia un receptor de la superficie celular para HER3 que se co-expresaba en la misma célula diana que expresaba el hIL-7R α . Este anticuerpo de control se usó a la misma concentración que 1A11 H3L4 (10 microgramos/mililitro) y se combinó con las mismas dos fuentes de complemento de conejo (Calbiochem e Invitrogen). Estos resultados demostraron que tanto las células diana como el complemento que se usaron en el ensayo podían inducir la citotoxicidad dependiente del complemento.

4.5.2 1A11 H3L4Fc ha reducido la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC)

Se perfilaron células mononucleares de sangre periférica purificadas procedentes de siete donantes humanos como células efectoras en un ensayo de ADCC. Estos experimentos se realizaron con una línea celular HEK 293 MSR II transducida con hIL-7r BacMam, usada como célula diana. Estas células se transdujeron (mdr 75) durante ~ 21 horas a 37°C, con un 5 por ciento de CO₂ en matraces de cultivo T175. Estas células adherentes después se retiraron de los matraces usando Tryple y se lavaron varias veces antes de "cargar" con europio. Estas células cargadas se combinaron en una placa de 96 pocillos (2x10⁴ células/25 microlitros/pocillo) que contenía anticuerpo anti-IL-7R durante 30 minutos a 37°C, con un 5 por ciento de CO₂. Después de la incubación, se añadieron células efectoras a relaciones de 200, 100, 50 y 25:1 (100 μ l/pocillo) y se volvieron a poner a 37°C con un 5 por ciento de CO₂ durante 2 horas.

Después de esta incubación, se retiraron 25 microlitros de sobrenadante y se añadieron a una placa de 96 pocillos que contenía 100 μ l/pocillo de solución de potenciación Delfia. La placa después se incubó en un agitador de placas a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se leyó en un lector de placas Victor V. Todo el europio liberado por las células lisadas en el sobrenadante circundante (citotoxicidad celular) se midió como unidades fluorescentes.

Estos ensayos compararon la capacidad para 1A11 H3L4 de "tipo silvestre" y la molécula con Fc inactivado 1A11 H3L4Fc de enlazarse a células efectoras humanas a través de sus receptores de Fc y destruir las células diana positivas para el receptor de IL-7. Los resultados globales de estos experimentos mostraron que el 1A11 H3L4Fc de Fc inactivado era cuando menos 2 veces menos potente para iniciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos que 1A11 H3L4 "natural". Estos resultados también mostraron que en seis de siete donantes, el anticuerpo inactivado podía inducir algún nivel de actividad ADCC (un donante mostró poca actividad con 1A11 H3L4 de tipo silvestre e inactivado). Los resultados se muestran en la Figura 2.

4.5.3 Enlace al receptor de Fc

Se evaluaron 1A11 H3L4 y 1A11 H3L4Fc con respecto a su capacidad para enlazarse a múltiples receptores de efectores de Fc (Fc Gamma I, IIa y IIIa) y FcRn de numerosas especies y se compararon con anticuerpos con Fc inactivado y de tipo silvestre de control. El trabajo se

realizó en la máquina de resonancia de plasmón de superficie Proteon XPR36 (BioRad). Los anticuerpos a ensayar se acoplaron a una microplaca biosensora GLM por acoplamiento de amina primaria. Los diversos receptores Fc γ se usaron como analitos a 2048 nM, 512 nM, 128 nM, 32 nM y 8 nM usando HBS-EP (pH 7,4) como tampón de procesamiento. Para la enlace al receptor FcRn se usaron FcRn humano, de cinomolgo, de ratón y de rata como analito a 2048 nM, 512 nM, 128 nM, 32 nM y 8 nM, realizándose el ensayo a pH 6,0 y pH 7,4. Todos los sensogramas de enlace tuvieron una doble referencia con una inyección 0 nM (es decir, tampón solo). Los datos se ajustaron al modelo de equilibrio intrínseco para el software de análisis de ProteOn.

La Tabla 11 muestra las afinidades generadas por la enlace del anticuerpo a los diversos receptores de Fc evaluados en este estudio, y muestra que 1A11 H3L4 y 1A11 H3L4Fc se comportaban de una manera comparable a sus homólogos de anticuerpos de control. Los anticuerpos con Fc inactivado (1A11 H3L4Fc) no mostraron enlace o mostraron un enlace muy reducida para receptores de Fc γ y, por lo tanto, no pudo realizarse un análisis preciso. Los datos para la enlace a FcRn mostraron que los anticuerpos con Fc inactivado y Fc de tipo silvestre tenían afinidades similares para todas las especies ensayadas, los datos de la tabla son para el ensayo a pH 6,0, la enlace estaba ausente o estaba muy reducida a pH 7,4 como era de esperar.

Tabla 11: Afinidades de enlace de 1A11 H3L4 (Fc inactivado y Fc de tipo silvestre) a receptores de Fc (nM)

5	Construc- ciones	Fcy2a (Arg)	Fcy2a (His)	Fcy3a (Phe)	Fcy (Val)	Fcy1	FcRn Human o	FcRn Cino	FcRn de ratón	FcRn de rata
10	Ac de Control (Fc TS)	1290	1500	1840	442	14,9	95	156	160	112
15	Ac de Control (Fc inactivado)	Enlace muy redu- cido	Sin enlace	Sin enlace	Sin enlace	Enlace muy redu- cido	154	195	171	118
20	1A11 H3L4	1250	1040	990	319	21,4	183	210	192	145
25	1A11 H3L4Fc	Enlace muy redu- cido	Sin enlace	Sin enlace	Sin enlace	Enlace muy redu- cido	158	248	207	163

4.6 Ensayos de potencia *in vitro*

4.6.1 Inhibición de la fosforilación de STAT5 estimulada por IL-7 por 1A11 y 1A11 H3L4

5 Para explorar el anticuerpo funcional contra IL-7R α , se incubaron medio de cultivo de hibridoma, anticuerpo de control positivo o muestras de sobrenadante de ensayo con células mononucleares de sangre periférica durante 30 minutos antes de estimular con IL-7. Las células no tratadas se analizaron como señal de fondo, mientras que las células tratadas con IL-7 se establecieron como control negativo. Después de 30 minutos de 10 incubación con los controles o muestras de ensayo, las células se estimularon con IL-7 durante 15 minutos a 37°C. Después, las células se fijaron con un 1,6 por ciento de paraformaldehído/PBS durante 10 minutos a 37°C y se permeabilizaron en metanol al 100 por ciento durante 20-30 15 min. Las células después se lavaron dos veces en tampón de tinción (BSA al 1 por ciento en PBS) y se tiñeron con anticuerpo anti-pStat5 marcado con Alexa-647 (BD Biosciences Inc N° 612599) durante 1 hora. Las muestras se analizaron en un instrumento BD LSR II FACS.

20 El anticuerpo monoclonal 1A11 parental bloquea la inducción por IL-7 de la fosforilación de STAT5 en células mononucleares de sangre periférica humanas con un valor de CI50 de 0.088 microgramos/mililitro (datos no mostrados). 1A11 H3L4 se ensayó en el mismo ensayo usando células mononucleares de sangre periférica de dos donantes a dos 25 concentraciones de IL-7 humanas (0,1 nanogramo/mililitro y 1

nanogramo/mililitro). 1A11 H3L4 demostró un valor de CI50 muy similar (media = 0.087 microgramos/mililitro) en comparación con 1A11, indicando que el proceso de humanización no afectaba a la capacidad del anticuerpo de inhibir pSTAT5 inducido por IL-7 (Figuras 3A y 3B).

5 4.6.2 Inhibición de la producción de IL-17 inducida por IL-7 por 1A11 H3L4

Se ensayó 1A11 H3L4 de acuerdo con el siguiente protocolo, para determinar su capacidad para inhibir la expansión de Th17. Se aislaron células CD4+ de acuerdo con el manual (Nº 130-091-155, Miltenyi). Se
10 mezclaron aproximadamente 1×10^6 /mililitro de las células CD4+ en 100 microlitros con un volumen igual de una concentración 2x de medio de diferenciación Th17 (anti-CD28 2 microgramos/mililitro + anti-IFN- γ 10 microgramos/mililitro + anti-IL-4 10 microgramos/mililitro + IL-1 β 12,5 nanogramos/mililitro + IL-23 20 nanogramos/mililitro + IL-6 50
15 nanogramos/mililitro) y se cultivaron a 37°C con un 5 por ciento de CO₂ durante 5 días. El tratamiento por las diversas citoquinas y factores de crecimiento en el medio de Th17 preferentemente diferenció las células CD4+ en linfocitos Th17. Las células CCR6+ de las células cultivadas diferenciadas en el día 5 se clasificaron usando BD FACS SORP Aria II.
20 Las células CCR6+ después se ajustaron a 2×10^6 /mililitro para el ensayo de producción de IL-17.

Para medir el nivel de IL-17 e IFN- γ , se preincubaron 100 microlitros de células CCR6+ con anticuerpo de ensayo durante 1 hora a 37°C y
25 después se mezclaron con 100 microlitros de IL-7 10 nanogramos/mililitro.

Las células se cultivaron durante 24-40 horas a 37°C con un suplemento de un 5 por ciento de CO₂. Los niveles de IFN-γ e IL-17 en 100 microlitros de sobrenadante de cultivo se midieron por FlowCytomix (Bender MedSystems) a 24 horas y 40 horas respectivamente.

5 1A11 H3L4 se ensayó en el ensayo de expansión de Th17 en un total de cuatro muestras de células CD4+ humanas (Figuras 4A-D). El anticuerpo humanizado demostró una inhibición significativa de la producción de IL-17 en dos muestras y tendencias de inhibición en las
10 otras dos muestras. Dada la variación de donante a donante en este ensayo, se concluye que 1A11 H3L4 puede bloquear la expansión de linfocitos Th17 mediada por IL-7.

4.6.3 Efectos sobre la señalización de TSLP

15 La subunidad de IL-7Rα se comparte tanto por el IL-7R como por el complejo de receptor TSLP (TSLPR). El efecto de 1A11 H3L4 sobre la señalización de TSLP se ensayó en un ensayo *in vitro* basado en la inducción por TSLP de la producción de TARC por monocitos de sangre humana. Se usó un anticuerpo anti-IL-7Rα comercial, R34.34, como control
20 positivo para bloquear la inducción por TSLP de TARC. Además, también se usó como control negativo una IgG1 humanizada con Fc inactivado (HulgG1; GRITS39633). Se usaron monocitos de 5 donantes, usándose TSLP a 1 nanogramo/ mililitro, 1A11 H3L4 y HulgG1 se usaron a dosis de 0.001-30 microgramos/mililitro y R34.34 se usó a 0.4, 2, y 10
25 microgramos/mililitro. También se evaluó la supervivencia celular por

recuento de células.

1A11 H3L4 no afectaba a la inducción por TSLP de TARC como se muestra en las Figuras 5A-E, mientras que para los mismos 5 donantes, R34.34 inhibía sustancialmente la producción de TARC. El anticuerpo de control negativo humanizado no tuvo ningún efecto sobre la producción de TARC. Esta serie de datos demuestra que 1A11 H3L4 no neutraliza la señalización por TSLP en monocitos humanos. Por lo tanto, se prevé que 1A11 H3L4 sea específico para la neutralización de la señalización de IL-7 a través de IL-7R y no afecte a la señalización por TSLP a través de TSLPR.

4.7 Ensayo de inhibición del receptor de IL7

La Tabla 12A muestra los valores de CI_{50} obtenidos en el ensayo 1 y muestra que todas las construcciones tenían mejores valores de CI_{50} que el mejor valor obtenido para la molécula de 1A11 H3L4 parental y que las dos moléculas superiores eran BPC4401 (anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bH) y BPC4398 (1A11 VH3 N98D L4). La Tabla 12B muestra los valores de CI_{50} obtenidos en el ensayo 2, y también muestra que las dos construcciones, BPC4401 (anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bH) y BPC4398 (1A11 VH3 N98D L4) tenían mejores valores de CI_{50} que el mejor valor obtenido para molécula de 1A11 H3L4 parental. Los ensayos 1 y 2 se realizaron en superficies de IL7R/CM5 separadas.

TABLA 12A: Valores de CI_{50} de ensayo de inhibición de receptor (Ensayo

1)

5

10

15

20

25

Identificador/número de molécula	Descripción de la Molécula	CI ₅₀ (nM)
BPC1142(GRITS37988) Réplica 1	Anti-IL7R 1A11 H3L4	19,42
BPC4398	Anti-IL7R 1A11 H3L4 N98D (variante de CDRH3)	14,94
BPC4399	Anti-IL7R 1A11 H3L4 N98E (variante de CDRH3)	15,8
BPC4400	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bE (variante de CDRH3)	15,33
BPC4401	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bH (variante de CDRH3)	14,75
BPC4402	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bI (variante de CDRH3)	15,23
BPC4403	Anti-IL7R 1A11 H3L4 F100bV (variante de CDRH3)	15,54
BPC1142 (HEK1029)	Anti-IL7R 1A11 H3L4	16,21

5

Identificador/número de molécula	Descripción de la Molécula	CI ₅₀ (nM)
BPC1142(GRITS37988) Réplica 2	Anti-IL7R 1A11 H3L4	17,23
La molécula parental (BPC1142-anti-IL7R 1A11 H3L4) se procesó múltiples veces dentro del experimento usando material expresado en CHO (GRITS37988) y material expresado en HEK (HEK1029).		

10

TABLA 12B: CI50 de ensayo de inhibición de receptor (Ensayo 2)

15

Identificador/número de molécula	Descripción de la molécula	CI ₅₀ (nM)
BPC1142(GRITS37988) Réplica 1	1A11 H3L4	16,44
BPC4398 Réplica1	1A11 VH3 N98D L4	14,86
BPC4401 Réplica1	1A11 VH3 F100bH L4	14,92
BPC1142(GRITS37988) Réplica 2	1A11 H3L4	16,57
BPC1142(GRITS37988)	1A11 H3L4	16,79

20

25

5

10

15

Identificador/número de molécula	Descripción de la molécula	CI ₅₀ (nM)
Réplica 3		
BPC4398 Réplica 2	1A11 VH3 N98D L4	14,17
BPC4401 (Réplica 2	1A11 VH3 F100bH L4	15,15
BPC1142(GRITS37988) Réplica 4	1A11 H3L4	17,35
La molécula parental (BPC1142-anti-IL7R 1A11 H3L4) se procesó múltiples veces dentro del experimento usando material expresado en CHO (GRITS37988), y ensayos replicados de BPC4398 (1A11 VH3 N98D L4) y BPC4401 (1A11 VH3 F100bH L4).		

20

25

4.8 Ensayo de enlace al polimorfo IL-7R

IL-7R existe como dos formas polimórficas, variante 1: Thr66-Ile128, variante 2: Ile66-Thr128. Se ensayó el enlace de 1A11H3L4 a ambas formas polimórficas. Una IgG anti-humano (GE Healthcare/ BIAcore™ BR-1008-39) se inmovilizó sobre un chip CM5 mediante acoplamiento de amina primaria hasta un nivel de aproximadamente 9,000 unidades de

resonancia (RU); entonces el 1A11H3L4 se capturó sobre esta superficie, y la IL7R se pasó por encima a 512 nM, 256 nM, 128 nM, 64 nM, 32 nM, y 16 nM, con una inyección 0 nM (es decir, con tampón solo), utilizada para referenciar doblemente las curvas de enlace, y se logró la regeneración de esta superficie utilizando MgCl₂ 3M. Los datos de enlace se ajustaron al modelo de 1:1 inherente al software de análisis BIAcore™ 3000. La ejecución se llevó a cabo utilizando HBS-EP como el tampón de ejecución, y se llevó a cabo a 25°C sobre el BIAcore™ 3000. La Tabla 13 muestra los datos obtenidos, y mostró que 1A11 H3L4 tenía la misma o similar afinidad de enlace a ambas variantes polimórficas (es decir, se enlaza a ambos polimorfos).

TABLA 13: Enlace al polimorfo IL-7R

1A11H3L4 con hIL7R variante 1: Thr66-Ile128	Kon (Ka) 1.52e5	Koff (Kd) 4.15e-4	KD 2.73e-9
1A11H3L4 con hIL7R variante 2: ILE66-Thr128	Kon (Ka) 1.46e5	Koff (Kd) 4.56e-4	KD 3.1e-9

Dentro de esta memoria descriptiva se ha descrito la invención con referencia a las modalidades, de una manera que hace posible que se escriba una memoria descriptiva clara y concisa. Se pretende y se debe apreciar que las modalidades se pueden combinar de diversas formas o se pueden separar sin apartarse de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una, dos o tres de las siguientes regiones determinantes de complementariedad:

- (i) CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2
- (ii) CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3
- (iii) CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o una CDRH3 como se expone en cualquiera de las SEQ ID N°: 132-137

comprendiendo el anticuerpo además cuando menos uno de un residuo de lisina en la posición 66, un residuo de leucina en la posición 69, o una valina en la posición 71 de la región variable de cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat).

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende un residuo de leucina en la posición 69 de la región variable de cadena pesada.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, el cual comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2, CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3 y CDRH3 como se muestra en la SEQ ID N°: 4.

4. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, el cual comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2, CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3, y CDRH3

con una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 132, 133, 134, 135, 136, ó 137.

5 5. El anticuerpo de la reivindicación 1, el cual comprende una región variable de cadena pesada con una secuencia seleccionada a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 121, 123, 125, 127, 129 o 131.

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, el cual comprende una región variable de cadena pesada de la SEQ ID N°: 13 (1A11.H3 V_H).

10 7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende una región variable de cadena pesada de la SEQ ID N°: 114 o SEQ ID N°: 118.

15 8. El anticuerpo de cualquiera de la reivindicación 5, el cual comprende una región variable de cadena pesada de la SEQ ID N°: 121 o SEQ ID N°: 123.

20 9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende además una región variable de cadena ligera que comprende una, dos o tres de las siguientes regiones determinantes de complementariedad:

(iv) CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5

(v) CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6

(vi) CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7.

25 10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en donde la región variable de cadena ligera comprende además cuando menos un residuo

seleccionado a partir del grupo que consiste en: un residuo de lisina en la posición 45, un residuo de prolina en la posición 46, un residuo de triptófano en la posición 47, un residuo de valina en la posición 58, un residuo de valina en la posición 60, un residuo de serina en la posición 70,
5 y un residuo de tirosina en la posición 71 de la cadena ligera de la región variable (numeración de acuerdo con Kabat).

11. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende
10 las siguientes regiones determinantes de complementariedad:

- (i) CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2
- (ii) CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3
- (iii) CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4, o una CDRH3 como se expone en cualquiera de las SEQ ID N°:132-137
15 y un dominio variable de cadena ligera que comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad:

- (iv) CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5
- (v) CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6
- (vi) CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7
20

en donde el anticuerpo comprende además un residuo de leucina en la posición 69 de la región variable de cadena pesada, y un residuo de prolina en la posición 46 de la región variable de cadena ligera.

12. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
25 el cual comprende una región variable de cadena ligera de la SEQ ID N°:

22.

13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, el cual comprende una cadena ligera de la SEQ ID N°: 115.

5 14. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde este anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID N°: 13, y una región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID N°: 22.

10 15. Una proteína de enlace a antígeno que comprende una o más de las siguientes regiones determinantes de complementariedad:

(i) CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2 o una CDR variante de la misma

(ii) CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3 o una CDR variante de la misma

15 (iii) CDRH3 como se expone en la SEQ ID N°: 4 o una CDR variante de la misma, o una CDRH3 como se expone en cualquiera de las SEQ ID N°: 132-137

(iv) CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5 o una CDR variante de la misma

20 (v) CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6 o una CDR variante la misma

(vi) CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7 o una CDR variante la misma

25 en donde cuando menos una de dichas CDRs es una CDR

variante, o en donde CDRH3 tiene una secuencia como se expone en las SEQ ID N°:132-137, y en donde dicha proteína de enlace a antígeno es capaz de enlazarse a CD127.

5 16. La proteína de enlace a antígeno de la reivindicación 15, la cual comprende las siguientes regiones determinantes de complementariedad:

- (i) CDRH1 como se expone en la SEQ ID N°: 2
- (ii) CDRH2 como se expone en la SEQ ID N°: 3
- 10 (iii) CDRH3 como se expone en cualquiera de las SEQ ID N°: 132-137
- (iv) CDRL1 como se expone en la SEQ ID N°: 5
- (v) CDRL2 como se expone en la SEQ ID N°: 6
- (vi) CDRL3 como se expone en la SEQ ID N°: 7.

15 17. La proteína de enlace a antígeno de la reivindicación 15 o 16, la cual comprende una región variable de cadena ligera de la SEQ ID N°: 22.

20 18. La proteína de enlace a antígeno de la reivindicación 15, 16 o 17, la cual comprende una región variable de cadena pesada de la SEQ ID N°: 13, con una o más de las sustituciones en la cadena pesada, siendo estas sustituciones seleccionadas a partir del grupo que consiste en: N98D, N98E, F100bE, F100bH, F100bI y F100bV.

25 19. La proteína de enlace a antígeno de acuerdo con la reivindicación 15, 16 o 17, la cual comprende una región variable de

cadena pesada de la SEQ ID N°: 121, 123, 125, 127, 129 o 131.

20. Una proteína de enlace a antígeno, la cual comprende una región de variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID N°: 13, y una región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID N°: 22.

21. Una proteína de enlace a antígeno de acuerdo con la reivindicación 20, la cual comprende una cadena pesada como se expone en la SEQ ID N°: 114 o en la SEQ ID N°: 118; y una cadena ligera como se expone en la SEQ ID N°: 115.

22. Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o proteína de enlace a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

23. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 22.

24. Una célula huésped recombinante que comprende un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 23.

25. Un anticuerpo o proteína de enlace a antígeno expresada por una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 24.

26. Un procedimiento para la producción de una proteína de enlace a antígeno, el cual comprende la etapa de cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 24 en un medio para producir la proteína de enlace a antígeno, y aislar o purificar la proteína de enlace a antígeno a partir del mismo.

27. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, en donde dicha etapa de cultivo se realiza en condiciones que conducen a la expresión del anticuerpo o de la proteína de enlace a antígeno en la célula huésped, y la secreción del anticuerpo desde la célula.

5 28. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de enlace a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 29. Un procedimiento para tratar a un sujeto que padece una enfermedad autoinmune o inflamatoria, el cual comprende la etapa de administrar al sujeto, una proteína de enlace a antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

15 30. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la enfermedad autoinmune o inflamatoria es esclerosis múltiple.

20

25

FIG. 1

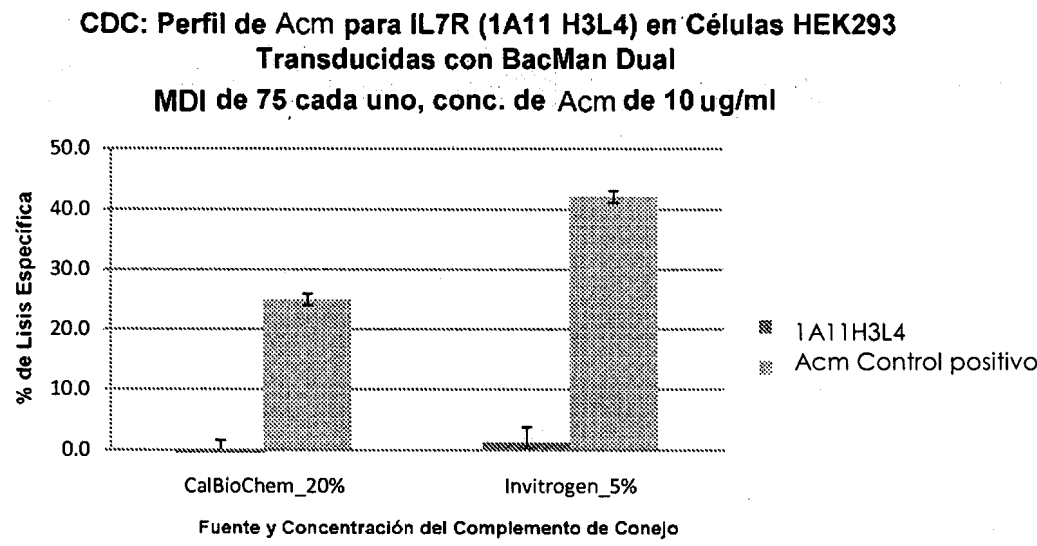


FIG. 2

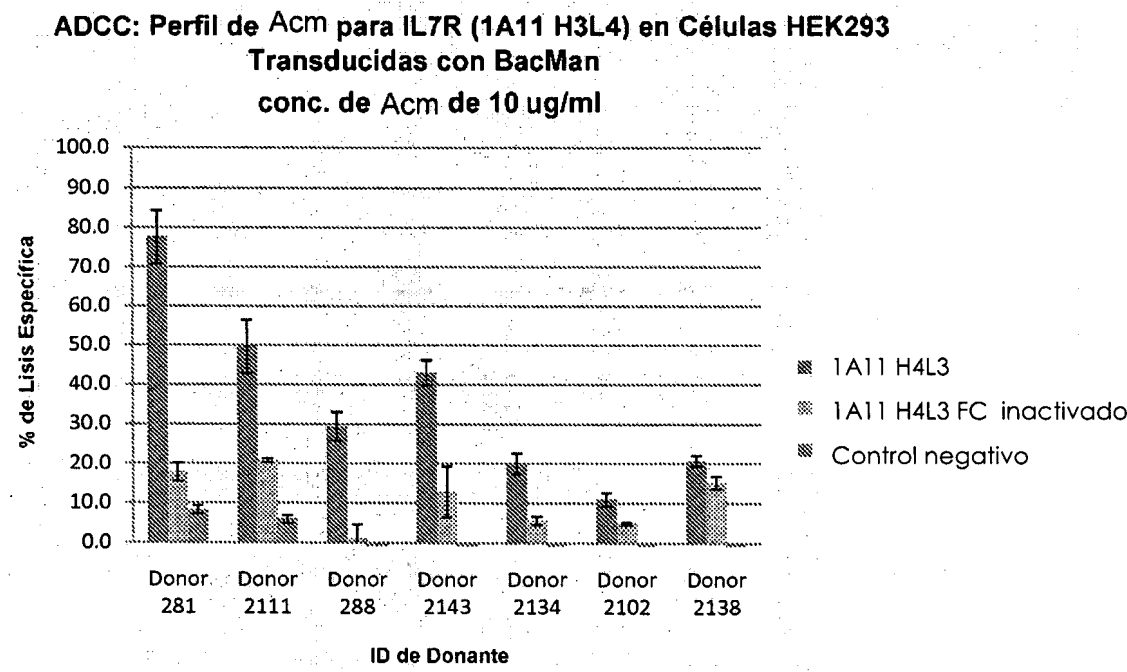


FIG. 3A

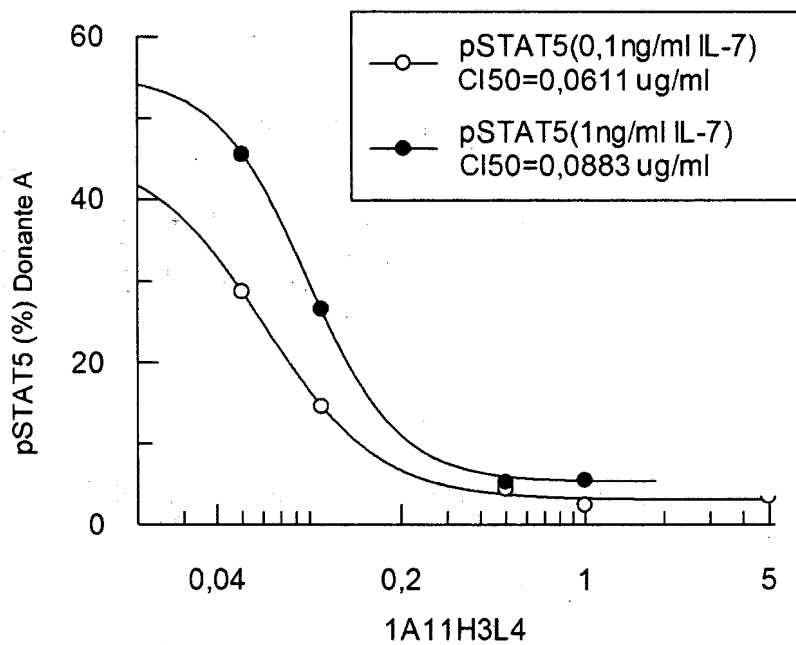


FIG. 3B

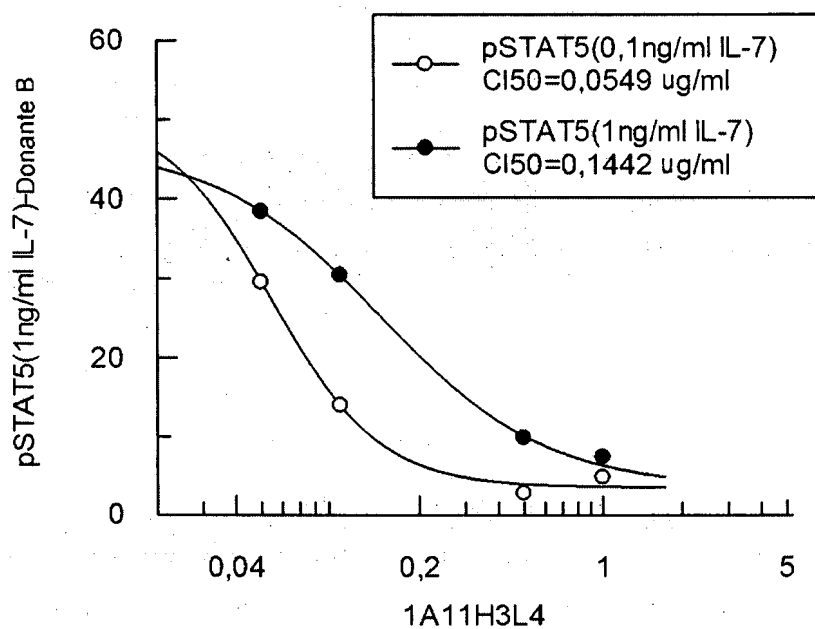


FIG. 4A

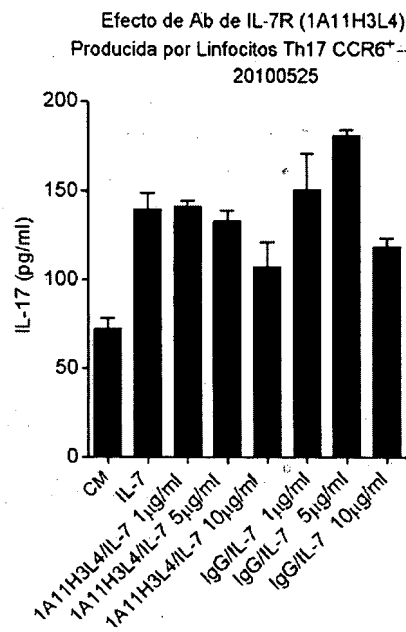


FIG. 4B

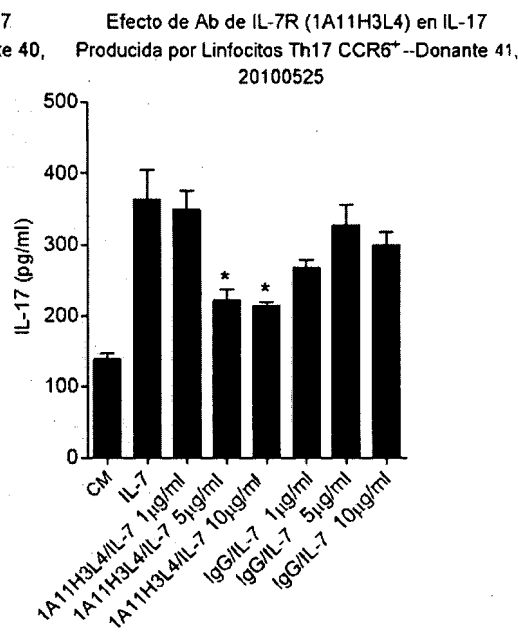


FIG. 4C

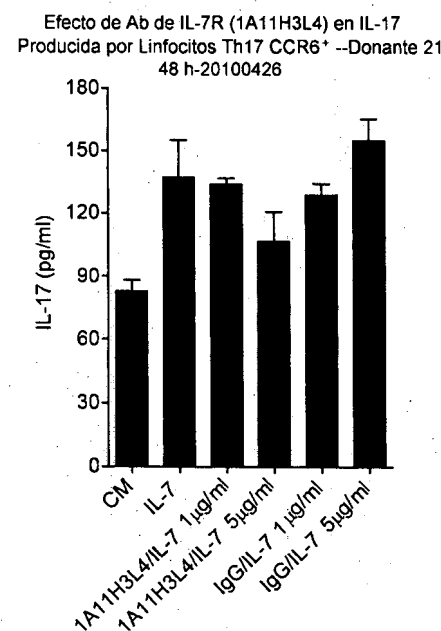
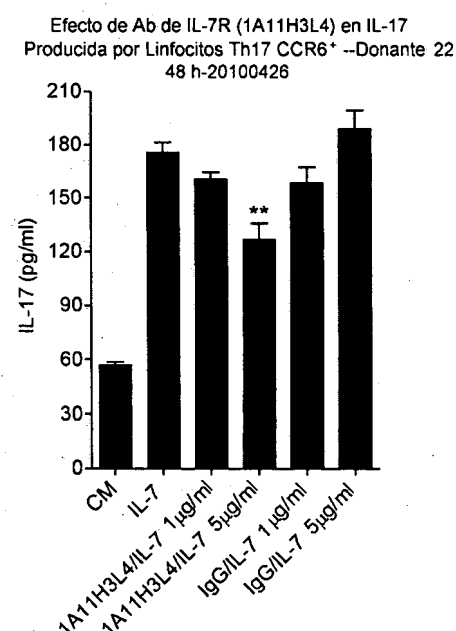
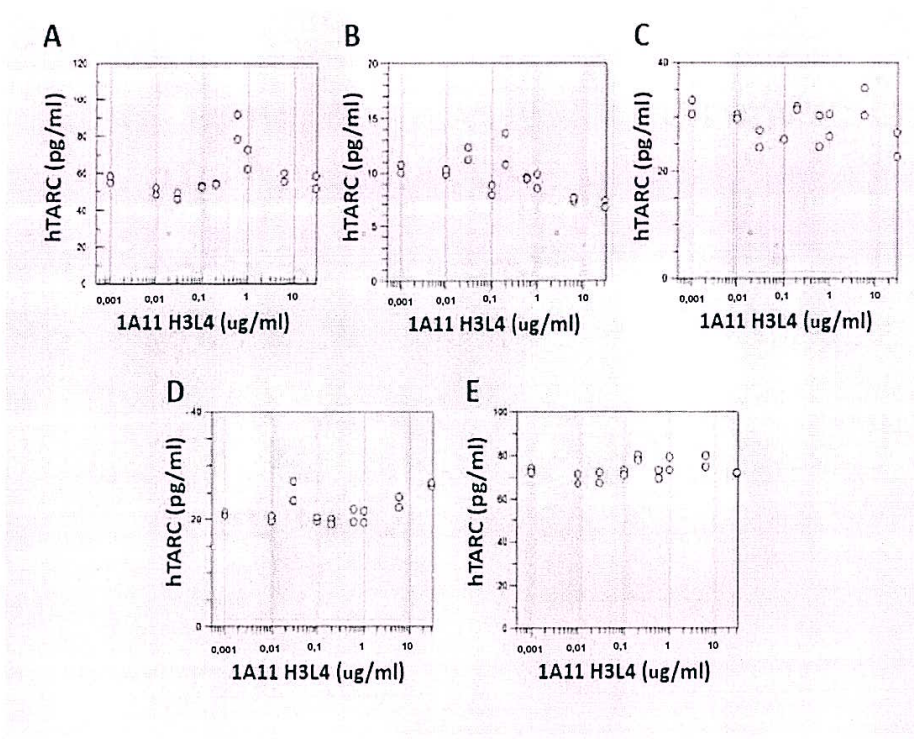


FIG. 4D





FIGS. 5A - 5E

PROTEÍNAS DE ENLACE A CD127

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 Se proporcionan proteínas de enlace a antígeno que se enlazan al receptor de IL-7 humano (CD127). Las proteínas de enlace a antígeno típicamente son anticuerpos, y son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en seres humanos, particularmente enfermedades autoinmunes, tales como la esclerosis múltiple.

10 **SECTOR:** Industria Biotecnológica farmacéutica, en particular inmunoglobulinas contra receptores de superficie de célula, los ácidos nucleicos que los codifican, los vectores de expresión y las células huésped empleadas para su producción, así como las composiciones farmacéuticas
15 que los comprenden las cuales son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias como la esclerosis múltiple.

20

25

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha:	Recorrido:
Tipo de Radicación:		Entrada:	Salida:
		Traslado:	Convenio:
Radicador:			Planilla:
ID	No. Radicación	Cons	Item
1			
2	12-124175-0		
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Item	Unidad de Conservación
X	CD
2	Disquetes
3	DVD
4	Fotos
5	Libro
6	Muestra Física
X	Otros
8	Planos
9	Periódico
10	Publicación Periódica
11	Sobre blanco tamaño carta
12	Sobre blanco tamaño oficio
13	Sobre de manila

Observaciones
Anexan Sobre Manila.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/28	
(22) Fecha de solicitud: 24-07-12		(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/299,010	(32) Fecha 28-01-10	(33) País US
		(72) Inventor(es): KIRBY, Ian; TAYLOR, Alexander, H.; WEBB, Thomas, Matthew y XUE, Yu.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 28-08-12	(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 04-08-11	
	Fecha de presentación de la solicitud: 26-01-11	No. publicación: WO 2011/094259 A3	
	No. de solicitud: PCT/US2011/022507		
(54) Título:		"PROTEÍNAS DE ENLACE A CD127"	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Se proporcionan proteínas de enlace a antígeno que se enlazan al receptor de IL-7 humano (CD127). Las proteínas de enlace a antígeno típicamente son anticuerpos, y son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en seres humanos, particularmente enfermedades autoinmunes, tales como la esclerosis múltiple.

Sector: Industria Biotecnológica farmacéutica, en particular inmunoglobulinas contra receptores de superficie de célula, los ácidos nucleicos que los codifican, los vectores de expresión y las células huésped empleadas para su producción, así como las composiciones farmacéuticas que los comprenden las cuales son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias como la esclerosis múltiple.

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
Industria y Comercio		DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES	
SUPERINTENDENCIA		TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION		PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) No. de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 24-07-12	
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28			
(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED			
(72) Inventor(es): KIRBY, Ian; TAYLOR, Alexander, H.; WEBB, Thomas, Matthew y XUE, Yu			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/299,010	28-01-10	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 28-08-12		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 04-08-11	
Fecha de presentación de la solicitud: 26-01-11		No. publicación: WO 2011/094259 A3	
No. de solicitud: PCT/US2011/022507			
(54) Título: PROTEÍNAS DE ENLACE A CD127			

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO	
SUPERINTENDENCIA		PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 24-07-12			
(51) Clasificación Internacional: C07K 16/28			
(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED			
(72) Inventor(es): KIRBY, Ian; TAYLOR, Alexander, H.; WEBB, Thomas, Matthew y XUE, Yu.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) <i>No. Prioridad</i> 61/299,010	(32) <i>Fecha</i> 28-01-10	(33) <i>País</i> US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 28-08-12		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 26-01-11 No. de solicitud: PCT/US2011/022507		Fecha: 04-08-11 No. Publicación: WO 2011/094259 A3	
(54) Título: PROTEÍNAS DE ENLACE A CD127			
(57) Resumen - Reivindicación(es): <u>Resumen.-</u> Se proporcionan proteínas de enlace a antígeno que se enlazan al receptor de IL-7 humano (CD127). Las proteínas de enlace a antígeno típicamente son anticuerpos, y son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos en seres humanos, particularmente enfermedades autoinmunes, tales como la esclerosis múltiple. Sector: Industria Biotecnológica farmacéutica, en particular inmunoglobulinas contra receptores de superficie de célula, los ácidos nucleicos que los codifican, los vectores de expresión y las células huésped empleadas para su producción, así como las composiciones farmacéuticas que los comprenden las cuales son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias como la esclerosis múltiple.			

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2011/022507

(22) International Filing Date:
26 January 2011 (26.01.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/299,010 28 January 2010 (28.01.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXO GROUP LIMITED** [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenfor, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **KIRBY, Ian** [GB/GB]; Gunnels Wood, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). **TAYLOR, Alexander, H.** [US/US]; 709 Swedeland Road, King Of Prussia, PA 19406 (US). **WEBB, Thomas, Matthew** [GB/GB]; Gunnels Wood, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). **XUE, Yu** [CN/US]; 709 Swedeland Road, King Of Prussia, PA 19406 (US).

(74) Agents: **FEDON, Jason** et al.; Glaxosmithkline, Corporate Intellectual Property, UW2220, 709 Swedeland Road, P.O. Box 1539, King of Prussia, Pennsylvania 19406-0939 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

 - as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
 - as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
 - of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

 - with international search report (Art. 21(3))
 - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
 - with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:
29 September 2011

WO 2011/094259 A3

- (54) Title: CD127 BINDING PROTEINS
- (57) Abstract: Antigen binding proteins which bind to human IL-7 receptor (CD127) are provided. The antigen binding proteins are typically antibodies, and are useful in the treatment of diseases or disorders in humans, particularly autoimmune diseases such as multiple sclerosis.

Sheet No

Box No. VIII(ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII(I) to (v) (in general and the specific Notes to Box No. VIII(ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to international application No. PCT/US2011/022507

GLAXO GROUP LIMITED is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

- (i) transfer of entitlement from inventors **Ian KIRBY** and **Thomas Matthew WEBB** to GlaxoSmithKline Services Unlimited by way of employment contract
- (ii) an assignment from GlaxoSmithKline Services Unlimited to Glaxo Group Limited effective 28 January 2010

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(ii)".

Form PCT/RO/101 (declaration sheet (ii)) (March 2001; reprint January 2003)

See Notes to the request form

Sheet No

Box No. VIII(ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII(I) to (v) (in general and the specific Notes to Box No. VIII(ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to international application No. PCT/US2011/022507

GLAXO GROUP LIMITED is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

- (i) an assignment from inventors **Alexander H TAYLOR** and **Yu XUE** to Glaxo Group Limited effective 28 January 2010.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(ii)".

Form PCT/RO/101 (declaration sheet (ii)) (March 2001; reprint January 2003)

See Notes to the request form

PCT/US2011/022507 26.07.2011

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PB64061	FOR FURTHER ACTION		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 11/22507	International filing date (<i>day/month/year</i>) 26 January 2011 (26.01.2011)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 28 January 2010 (28.01.2010)	
Applicant GLAXO GROUP LIMITED			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/22507

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☒ on paper
- ☐ in electronic form
- b. (time)
- ☒ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
GenCore ver 6.3 SEQ ID NOs: 2-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/22507

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☐ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☒ Claims Nos.: 7, 9-13, 18, 19 and 22-30 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. Groups I+: Claims 1-6, 8, 14-17, 20 and 21, directed to a humanized antibody comprising a heavy chain variable region comprising one, two or three of the following complementarity determining regions: CDRH1 as set out in SEQ ID NO:2; CDRH2 as set out in SEQ ID NO: 3; CDRH3 as set out in SEQ ID NO: 4 or any of SEQ ID NOs: 132-137; wherein the antibody further comprises at least one of a lysine residue at position 66, a leucine residue at position 69, or a valine at position 71 of the heavy chain variable region (Kabat numbering); and wherein said antibody may further comprise a CDRL1 as set out in SEQ ID NO: 5; CDRL2 as set out in SEQ ID NO: 6; and CDRL3 as set out in SEQ ID NO: 7; limited to wherein the antibody comprises CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 and CDRL3 as set out in SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, 6 and 7, respectively. - Please see extra sheet for continuation - 1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3 and 15; limited to SEQ ID NOs: 2-7 Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

PCT/US2011/022507 26.07.2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/22507

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/28 (2011.01) USPC - 530/388.22 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 530/388.22 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 530/388.22 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (PGPB, USPT, EPAB, JPAB); Google Scholar, GenCore sequence search (AA) Search terms: CD127, IL-7R, antibody, monoclonal, humanized, CDRH 1-3, CDRL 1-3; SEQ ID NOs: 2-7		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 2009/0226442 A1 (HUET et al.) 10 September 2009 (10.09.2009). Especially para [0035], SEQ ID NO: 75.	1, 2 — 3, 15
Y — A	US 2010/0016556 A1 (CARTER et al.) 21 January 2010 (21.01.2010). Especially para [0036], [0038], [0040], sheet 6 fig 5.	1, 2 — 3, 15
A	US 2003/0229208 A1 (QUEEN et al.) 11 December 2003 (11.12.2003). Esp. SEQ ID NO: 23	3, 15
A	US 2005/0025763 A1 (WILLIAMS et al.) 3 February 2005 (03.02.2005). Esp. SEQ ID NO: 17	3, 15
X,P	US 2010/0040616 A1 (LEUNG et al.) 18 February 2010 (18.02.2010). Esp. para [0058], [0062], SEQ ID NOs: 71,73,76,77	1-3, 15
A	US 2002/0142359 A1 (COPLEY et al.) 3 October 2002 (03.10.2002). Esp. SEQ ID NO: 26	15
A	US 2008/0226621 A1 (FUNG et al.) 18 September 2008 (18.09.2008). Esp. SEQ ID NO: 36	15
A	US 2007/0066798 A1 (SCHMITT et al.) 22 March 2007 (22.03.2007). Esp. SEQ ID NO: 6	15
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 July 2011 (18.07.2011)		Date of mailing of the international search report 26 JUL 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/22507

Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

(Applicant may pay for additional sequences based on further CDR sequences as above to be searched by specifying the CDR sequence and associated full-chain sequences, and paying an additional invention search fee for each elected sequence. The actual claims to be searched will depend upon the scope of the elected sequences).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions described by the Group I+ claims share the following common technical elements: a humanized antibody comprising a heavy chain variable region comprising one, two or three of the following complementarity determining regions: CDRH1 as set out in SEQ ID NO:2; CDRH2 as set out in SEQ ID NO: 3; CDRH3 as set out in SEQ ID NO: 4 or any of SEQ ID NOs: 132-137. This shared technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2009/0226442 A1 to Huet et al., which discloses antibodies (abstract), wherein a V.sub.h CDR1 comprises SEQ ID NO: 75 (para [0019]), wherein SEQ ID NO: 75 is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 2. The claims of Group I share a further common technical element, wherein the antibody further comprises at least one of a lysine residue at position 66, a leucine residue at position 69, or a valine at position 71 of the heavy chain variable region (Kabat numbering). This common technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2010/0016556 A1 to Carter et al., which teaches "obtaining the amino acid sequence of at least a portion of an import, non-human antibody variable domain having a CDR and a FR...substituting an amino acid residue for the consensus amino acid residue at least one of the following sites:...69H...In preferred embodiments, the non-CDR residue substituted at the consensus FR site is the residue found at the corresponding location of the non-human antibody" (para [0036]) (see also para [0040]), and Fig. 5, which aligns the muxCD3 sequence heavy chain sequence with a humanized (huxCD3v1) and human (hulll) sequence, wherein the amino acid for the human and humanized sequence at residue 69 is isoleucine, and (according to para [0036] and [0040], above) would be replaced with the murine residue, leucine. Therefore, the inventions of Groups I+ lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

PCT/US2011/022507 26.07.2011

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: JASON FEDON
GLAXOSMITHKLINE
CORPORATE INTELLECTUAL PROPERTY,
UW2220
709 SWEDELAND ROAD, P.O. BOX 1539
KING OF PRUSSIA, PA 19406-0939

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Applicant's or agent's file reference PB64061		Date of mailing (day/month/year) 26 JUL 2011
FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below		
International application No. PCT/US 11/22507	International filing date (day/month/year) 26 January 2011 (26.01.2011)	Priority date (day/month/year) 28 January 2010 (28.01.2010)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC(8) - C07K 16/28 (2011.01) USPC - 530/388.22		
Applicant GLAXO GROUP LIMITED		

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Date of completion of this opinion 18 July 2011 (18.07.2011)	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774
---	---	--

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY	International application No. PCT/US 11/22507
Box No. 1 Basis of this opinion	
1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of: ☒ the international application in the language in which it was filed. ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)). 2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a)). 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished: a. (means) ☒ on paper ☐ in electronic form b. (time) ☒ in the international application as filed ☐ together with the international application in electronic form ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search 4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 5. Additional comments: GenCore ver 6.3 SEQ ID NOs: 2-7	

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 11/22507

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 7, 9-13, 18, 19 and 22-30

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 7, 9-13, 18, 19 and 22-30 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

Claims 7, 9-13, 18, 19 and 22-30 are not formed according to the second and third sentences of Rule 6.4(a) regarding multiply dependent claims

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 7, 9-13, 18, 19 and 22-30

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

- ☐ See Supplemental Box for further details.

PCT/US2011/022507 26.07.2011

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 11/22507

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
- ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
- ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
- ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
- ☒ not complied with for the following reasons:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-6, 8, 14-17, 20 and 21, directed to a humanized antibody comprising a heavy chain variable region comprising one, two or three of the following complementarity determining regions: CDRH1 as set out in SEQ ID NO:2; CDRH2 as set out in SEQ ID NO: 3; CDRH3 as set out in SEQ ID NO: 4 or any of SEQ ID NOs: 132-137; wherein the antibody further comprises at least one of a lysine residue at position 66, a leucine residue at position 69, or a valine at position 71 of the heavy chain variable region (Kabat numbering); and wherein said antibody may further comprise a CDRL1 as set out in SEQ ID NO: 5; CDRL2 as set out in SEQ ID NO: 6; and CDRL3 as set out in SEQ ID NO: 7; limited to wherein the antibody comprises CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 and CDRL3 as set out in SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 5, 6 and 7, respectively. (Applicant may pay for additional sequences based on further CDR sequences as above to be searched by specifying the CDR sequence and associated full-chain sequences, and paying an additional invention search fee for each elected sequence. The actual claims to be searched will depend upon the scope of the elected sequences).

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions described by the Group I+ claims share the following common technical elements: a humanized antibody comprising a heavy chain variable region comprising one, two or three of the following complementarity determining regions: CDRH1 as set out in SEQ ID NO:2; CDRH2 as set out in SEQ ID NO: 3; CDRH3 as set out in SEQ ID NO: 4 or any of SEQ ID NOs: 132-137. This shared technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2009/0226442 A1 to Huet et al., which discloses antibodies (abstract), wherein a V.sub.h CDR1 comprises SEQ ID NO: 75 (para [0019]), wherein SEQ ID NO: 75 is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 2. The claims of Group I share a further common technical element, wherein the antibody further comprises at least one of a lysine residue at position 66, a leucine residue at position 69, or a valine at position 71 of the heavy chain variable region (Kabat numbering). This common technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2010/0016556 A1 to Carter et al., which teaches "obtaining the amino acid sequence of at least a portion of an import, non-human antibody variable domain having a CDR and a FR...substituting an amino acid residue for the consensus amino acid residue at least one of the following sites:...69H...In preferred embodiments, the non-CDR residue substituted at the consensus FR site is the residue found at the corresponding location of the non-human antibody" (para [0036]) (see also para [0040]), and Fig. 5, which aligns the muxCD3 sequence heavy chain sequence with a humanized (huxCD3v1) and human (hull1) sequence, wherein the amino acid for the human and humanized sequence at residue 69 is isoleucine, and (according to para [0036] and [0040], above) would be replaced with the murine residue, leucine. Therefore, the inventions of Groups I+ lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-3 and 15 limited to SEQ ID NOs: 2-7

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY				International application No. PCT/US 11/22507	
Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement					
1. Statement					
Novelty (N)	Claims	1-3, 15		YES	
	Claims	NONE		NO	
Inventive step (IS)	Claims	3, 15		YES	
	Claims	1, 2		NO	
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3, 15		YES	
	Claims	NONE		NO	
2. Citations and explanations:					
Claims 1 and 2 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2009/0226442 A1 to HUET et al. (hereinafter "Huet"), in view of US 2010/0016556 A1 to CARTER et al. (hereinafter "Carter"). As to claim 1, Huet teaches a humanized antibody (para [0035]) comprising a heavy chain variable region comprising the following complementarity determining region: (i) CDRH1 as set out in SEQ ID NO: 2 (SEQ ID: 75. 1 GYTMN 5 has 100% sequence identity with application SEQ ID NO: 2). Huet does not teach wherein the antibody further comprises at least one of a lysine residue at position 66, a leucine residue at position 69, or a valine at position 71 of the heavy chain variable region (numbering according to Kabat). However, Carter teaches that the antibody further comprises at least one of a leucine residue at position 69 (para [0036]-[0038]; "Certain alternate embodiments of the methods of this invention comprise obtaining the amino acid sequence of at least a portion of an import, non-human antibody variable domain having a CDR and a FR, obtaining the amino acid sequence of at least a portion of a consensus antibody variable domain having a CDR and a FR, substituting the non-human CDR for the human CDR in the consensus antibody variable domain. [0038] (in the FR of the variable domain of the heavy chain-69H"; para [0040]- This invention also relates to a humanized antibody comprising the CDR sequence of an import, non-human antibody and the FR sequence of a human antibody, wherein an amino acid residue within the human FR sequence located at anyone of the sites 69H has been substituted by another residue. In preferred embodiments, the residue substituted at the human FR site is the residue found at the corresponding location of the non-human antibody from which the nonhuman CDR was obtained"; see sheet 6 fig 5- leucine 69 substituted from mouse muxCD3). As to claim 2, Carter further teaches that the antibody comprises a leucine residue at position 69 of the heavy chain variable region. (para [0036-0038], [0040], sheet 6, fig 5, leucine at position 69 from muxCD3). Claim 3 meets the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3) because the prior art does not teach or suggest a heavy chain variable region comprising CDRH1 as set out in SEQ ID NO:2, CDRH2 as set out in SEQ ID NO:3 and CDRH3 as set out in SEQ ID NO:4. As to claim 3, Huet teaches a heavy chain variable region comprising CDRH1 as set out in SEQ ID NO: 2 (SEQ ID: 75. 1 GYTMN 5 has 100% sequence identity with application SEQ ID NO: 2). Huet does not teach CDRH2 as set out in SEQ ID NO: 3 and CDRH3 as set out in SEQ ID NO: 4. The available prior art, US 2003/0229208 A1 to QUEEN et al. (hereinafter "Queen") teaches a heavy chain sequence with only 92.5% sequence homology to SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 23; 92.5% sequence identity) and US 2005/0025763A1 to WILLIAMS et al. (hereinafter "Williams") teaches a heavy chain sequence with only 90.5% sequence homology to SEQ ID NO: 4 (SEQ ID NO: 17; 90.5% sequence homology). There is no prior art that teaches SEQ ID NOs: 2-4 as part of a single heavy chain variable sequence. The best available art, US 2010/0040616 A1 to LEUNG et al. (hereinafter "Leung") teaches a heavy chain variable region comprising CDRH1 as set out in SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 71; 100% sequence identity), CDRH2 as set out in SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 71, 100% sequence identity) and CDRH3 as set out in SEQ ID NO: 4 (SEQ ID NO: 71, 100% sequence identity). However, Leung was published after the priority date of the application. There is nothing of record to lead one of ordinary skill in the art to modify Huet, Queen and/or Williams to arrive at the claimed invention -----Continued in Supplementary Box-----					

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY	International application No. PCT/US 11/22507
Supplemental Box	
In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient. Continuation of: Box V-2 (Citations and Explanations) Claim 15, meets the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3) because the prior art does not teach or suggest an antigen binding protein comprising one or more of the following complementarity determining regions: (i) CDRH1 as set out in SEQ ID NO: 2 or a variant CDR thereof (ii) CDRH2 as set out in SEQ ID NO: 3 or a variant CDR thereof (iii) CDRH3 as set out in SEQ ID NO: 4 or a variant CDR thereof, (iv) CDRL1 as set out in SEQ ID NO: 5 or a variant CDR thereof (v) CDRL2 as set out in SEQ ID NO: 6 or a variant CDR thereof (vi) CDRL3 as set out in SEQ ID NO: 7 or a variant CDR thereof wherein said antigen binding protein is capable of binding to CD127. As to claim 15, the available prior art, Huet teaches (i) CDRH1 as set out in SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 75, 100% sequence identity). Furthermore, US 2002/ 0142359 A1 to COPLEY et al. (hereinafter "Copley") teaches (iv) CDRL1 as set out in SEQ ID NO: 5 (SEQ ID NO: 26; 100% sequence identity). In addition, US 2008/0226621A1 to FUNG et al. (hereinafter "Fung") teaches (v) CDRL2 as set out in SEQ ID NO: 6 (SEQ ID NO: 36; 100% sequence identity). Furthermore, Queen teaches (ii) a variant of CDRH2 as set out in SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 23; 92.5% sequence identity with one amino acid variation). In addition, Williams teaches (iii) a variant of CDRH3 as set out in SEQ ID NO: 4 (SEQ ID NO: 17; 90.8% sequence identity and 1 amino acid variation). In addition, US 20070066798 A1 to SCHMITT et al. (hereinafter "Schmitt") teaches (vi) a variant of CDRL3 as set out in SEQ ID NO: 7 (SEQ ID NO: 6; 90.6% sequence identity and 1 amino acid variation). However, none of Huet, Copley, Fung, Queen, William or Schmitt teaches said antigen binding protein is capable of binding to CD127. The best available art, Leung teaches a heavy chain variable region comprising CDRH1 as set out in SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO: 71; 100% sequence identity), CDRH2 as set out in SEQ ID NO:3 (SEQ ID NO: 71, 100% sequence identity) and CDRH3 as set out in SEQ ID NO:4 (SEQ ID NO: 71, 100% sequence identity) wherein said antigen binding protein is capable of binding to CD127 (para [0058] and [0062]; " Also provided by the invention is a method of treatment of an autoimmune disease or inflammatory disorder comprising administering to a patient an anti-CD127 antibody, wherein the antibody comprises [0062] (iv) the heavy chain variable region of SEQ ID NO: 71"). However, Leung was published after the application's priority date. There is nothing of record to lead one of ordinary skill in the art to modify Huet, Copley, Fung, Queen, William and/or Schmitt to arrive at the claimed invention. Claims 1-3 and 15 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used by industry.	

237

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

236
238

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-02-440
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, Documento escrito en inglés y en español.

Notarización del documento es español.

Hay un sello rojo sobre una cinta verde.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado por Martin E Buchner
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 26 de agosto de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número G499865
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (ilegible)
- Sello de la Oficina de Asuntos
- M. Monaghan

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

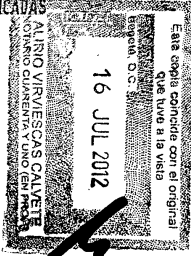


MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

258650
Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2004 SET -3 P 12
Mes
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



Exteriores y del Commonwealth

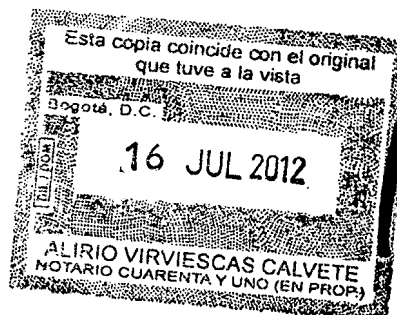
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse en la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido a mi mejor saber y entender, este día 2 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, **Martin Emil BUCHNER**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **Peter John GIDDINGS**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "**GLAXO GROUP LIMITED**", Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número **305979**, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra;

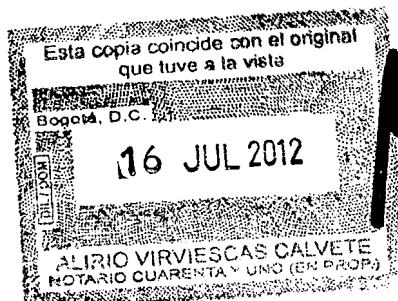
QUE el citado Señor Don **Peter John GIDDINGS** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 30 de enero de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy veintiseis de agosto del año dos mil cuatro.



Martin Emil BUCHNER
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Martin E Buchner**
a été signé par

3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de

4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

5. at London/à Londres

Certified/Attesté
6. the/le **26 August 2004**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G499865**

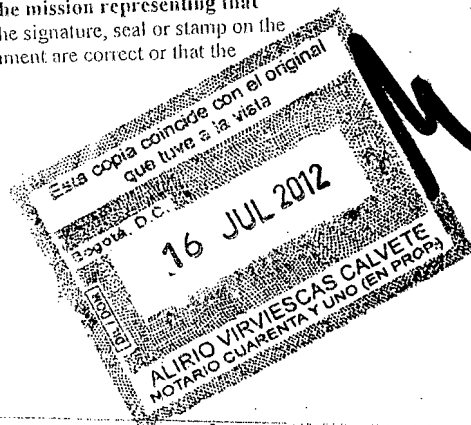
9. Stamp:
timbre:

10. Signature: **M. Monaghan**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.



239
241
Los abajo firmados, **GLAXO GROUP LIMITED**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Inglaterra y Gales...

con domicilio en **Glaxo Wellcome House**
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Inglaterra

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado



The undersigned, **GLAXO GROUP LIMITED**, a corporation organized and existing under the laws of England and Wales.

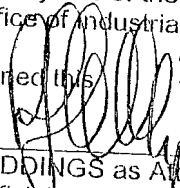
domiciled at **Glaxo Wellcome House**
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Great Britain

hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this **23 AUG 2004**


Peter John GIDDINGS as Attorney and
Authorised Official
NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



No. 12-124175- -00000-0000

Fecha: 2012-07-24 17:02:02

Dep. 2020 DIR.NUEVASOR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 242

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 240

ADMISION A TRAMITE = NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- 1 ☒ Indicación que se solicita una PCT
- 2 ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- 214 ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- 240 ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐