



No. 12-144298- -00000-0000

Fecha: 2012-08-24 16:32:43 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI RECEPTOR DE IL-7
Y PROCEDIMIENTOS.

SOLICITANTE: RINAT NEUROSCIENCE CORP.

DIRECCIÓN: 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 24 Agosto de 2012

P2012/000072

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-144298- -00000-0000

Fecha: 2012-08-24 16:32:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3

PETITORIO - FORMULARIO

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000072

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: **RINAT NEUROSCIENCE CORP.**

Dirección: **230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080**

Nacionalidad o Domicilio: **Estados Unidos**

Lugar de Constitución: **Estados Unidos**

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **CARLOS R. OLARTE**

Dirección: **Carrera 5 No. 34-03 Bogotá, Colombia**

Teléfono: **601-7700** Fax: **601-7799**

E-mail: **office@olartemoure.com**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número **79.782.747Bta**
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: **(1) Li-Fen LEE; (2) Chia-Yang LIN; (3) Wenwu ZHAI.**

Dirección: **230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América**

Nacionalidad o Domicilio: **(1) Estadounidense (2) China (3) Británica**

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/IB2011/050792** Fecha **Febrero 24, 2011**

Publicación Internacional No. **WO 2011/104687 A1** Fecha **Septiembre 01, 2011**

6

Título (54) **ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI RECEPTOR DE IL-7 Y PROCEDIMIENTOS.**

Clasificación Internacional (51) **C07K 16/28; C12N 15/13; A61K 39/395; A61P 37/00; A61P 3/10; A61P 37/06.**

Prioridad		(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐		US	Febrero 24, 2010	61/307.670
		US	Agosto 12, 2010	61/438,205

9

Comprobante de pago No. **12-0052249** Fecha **Mayo 25 de 2012**

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☒

Declaraciones. Declaración bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☒

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☒

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

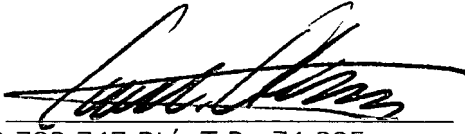
11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

- / -

Julio 12 de 2012 - 14:34:39

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:			Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	1712-144298-05		1.
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
X	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

1 Anexo CD



No. 12-144298- -00000-0000

Fecha: 2012-08-24 16:32:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 3

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

☐	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

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	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 ☐

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

Nota del traductor:

El documento adjunto de poder de Rinat Neuroscience Corp, a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

Reconocimiento para todos los propósitos de California

Estado de California

Condado de San Mateo

El día 11 de Septiembre de 2006, ante mí, Beth Calvin, Notario Público, se presentó personalmente Carol Stratford, a quien conozco personalmente como la persona cuyo nombre está suscrito al documento y reconoció ante mí que ejecutó el mismo en su calidad autorizada y que por su firma en el instrumento, la persona o la entidad en cuyo nombre actuó, ejecutó el instrumento.

En constancia firmo y pongo mi sello oficial. (Firmado)

Sello: Beth Calvin, comisión No. 1440211- Notario Público de California, Condado de Santa Clara. Mi comisión vence el 19 de Septiembre de 2007.

Opcional:

Aunque la información siguiente no es exigida por ley, puede ser valiosa para que las personas confíen en el documento y puede evitar que se


Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

quite fraudulentamente y que se coloque este formulario a otro documento.

Descripción del documento adjunto:

Documento de Poder.

Fecha del documento: 9/11/06.

Número de páginas: 1.

Firmantes además del ya mencionado: Ninguno.

Apostilla adjunta:

ESTADO DE CALIFORNIA	
SECRETARIO DE ESTADO	
APOSTILLE	
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Estados Unidos de América
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Beth Calvin
3. Actuando en calidad de:	Notario Público, Estado de California.
4. Lleva el sello/estampilla de:	Beth Calvin, Notario Público, Estado de California
<u>Certificado</u>	
5. En:	Sacramento, California
6. El:	Día 15 de Septiembre de 2006
7. Por:	Subsecretario de Estado, Estado de California.
8. Bajo el No.	304683
9. Sello:	Gran Sello del Estado de California
10. Firma:	Bruce McPherson, Secretario de Estado

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Rinat N. - Poder"

Fecha: 17 de Octubre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8602


Traductor
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

RINAT NEUROSCIENCE CORP.

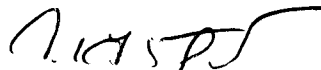
domiciled in

domiciliado en

230 E. Grand Avenue, South San Francisco, California 94080, U.S.A.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

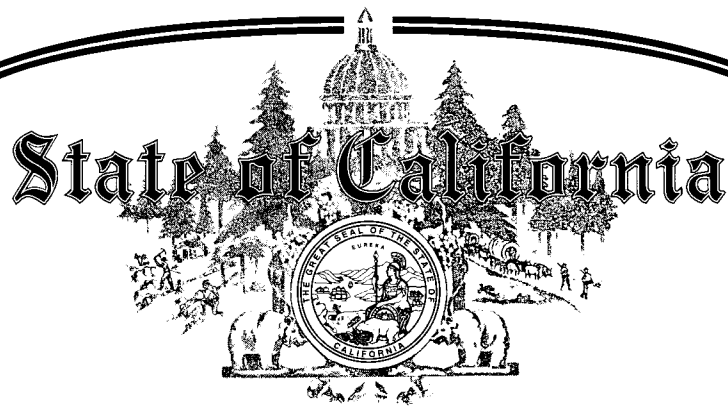
por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma: 

Date/Fecha: 11 September 2006

City/Country/Ciudad,País: South San Francisco, CA, U.S.A.

So. San Francisco, CA



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by Beth Calvin*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Beth Calvin, Notary Public,*
State of California

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 15th day of September 2006*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 304683*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*



Secretary of State



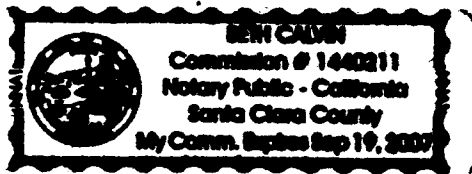
CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of San Mateo } ss.

On 11 September 2006 before me, Beth Calvin, Notary Public,
Date Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")
personally appeared Carol Stratford,
Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence



to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

[Signature]
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Power of Attorney

Document Date: 9/11/06 Number of Pages: 1

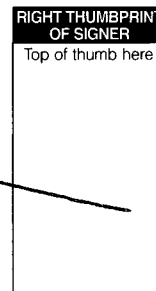
Signer(s) Other Than Named Above: none

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____



VIII-1-1	Declaration: Identity of the Inventor Declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i))	In relation to this international application
	Name (LAST, First) Address	LIN, Chia-Yang of Rinat Neuroscience Corporation 230 East Grand Avenue South San Francisco, California 94080 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	LEE, Li-Fen of Rinat Neuroscience Corporation 230 East Grand Avenue South San Francisco, California 94080 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	ZHAI, Wenwu of Rinat Neuroscience Corporation 230 East Grand Avenue South San Francisco, California 94080 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent 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 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION US 61/307,670 filed 24 February 2010 (24.02.2010) is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from LIN, Chia-Yang to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 01 April 2010 (01.04.2010)
VIII-2-1(i v)		an assignment from LEE, Li-Fen to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 01 April 2010 (01.04.2010)
VIII-2-1(i v)		an assignment from ZHAI, Wenwu to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 01 April 2010 (01.04.2010)

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-2	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent 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 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORPROATION US 61/438,205 filed 31 January 2011 (31.01.2011) is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(i v)		an assignment from LIN, Chia-Yang to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 22 February 2011 (22.02.2011)
VIII-2-2(i v)		an assignment from LEE, Li-Fen to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 22 February 2011 (22.02.2011)
VIII-2-2(i v)		an assignment from ZHAI, Wenwu to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 23 February 2011 (23.02.2011)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION is entitled to claim priority of earlier application No. 61/307,670 by virtue of the following:
VIII-3-1(i v)		an assignment from LIN, Chia-Yang to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 01 April 2010 (01.04.2010)
VIII-3-1(i v)		an assignment from LEE, Li-Fen to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 01 April 2010 (01.04.2010)
VIII-3-1(i v)		an assignment from ZHAI, Wenwu to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 01 April 2010 (01.04.2010)

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-3-2	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION is entitled to claim priority of earlier application No. 61/438,205 by virtue of the following:
VIII-3-2(i v)		an assignment from LIN, Chia-Yang to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 22 February 2011 (22.02.2011)
VIII-3-2(i v)		an assignment from LEE, Li-Fen to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 22 February 2011 (22.02.2011)
VIII-3-2(i v)		an assignment from ZHAI, Wenwu to RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION, dated 23 February 2011 (23.02.2011)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 September 2011 (01.09.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/104687 A1

(51) International Patent Classification:

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

(21) International Application Number:

PCT/IB2011/050792

(22) International Filing Date:

24 February 2011 (24.02.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/307,670 24 February 2010 (24.02.2010) US
61/438,205 31 January 2011 (31.01.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION** [US/US]; 230 East Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **LIN, Chia-Yang** [US/US]; Rinat Neuroscience Corporation 230 East, Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US). **LEE, Li-Fen** [CN/US]; Rinat Neuroscience Corporation 230 East, Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US). **ZHAI, Wenwu** [GB/US]; Rinat Neuroscience Corporation 230 East, Grand Avenue, South San Francisco, CA 94080 (US).

(74) Agents: **KLEIMAN, Gabriel L.** et al.; Pfizer Inc., 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (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 the identity of the inventor (Rule 4.17(i))
- 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))

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))

(54) Title: ANTAGONIST ANTI-IL-7 RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS

(57) Abstract: The present invention provides antagonizing antibodies that bind to interleukin-7 receptor (IL-7R). The invention further provides a method of obtaining such antibodies and antibody-encoding nucleic acids. The invention further relates to therapeutic methods for use of these antibodies and antigen-binding portions thereof for the treatment and/or prevention of type 2 diabetes and immunological disorders, including type 1 diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, graft-versus-host disease, and lupus.



WO 2011/104687 A1

ANTAGONIST ANTI-IL-7 RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS

Field

The present invention relates to antibodies, e.g., full length antibodies or antigen-
5 binding portions thereof, that antagonize the activity of interleukin-7 receptor (IL-7R),
including its interaction with IL-7. The invention further relates to compositions
comprising an IL-7R antagonist, such as an antagonist IL-7R antibody, and methods of
using the IL-7R antagonist as a medicament. The IL-7R antagonist can be used in the
prevention and/or treatment of type 2 diabetes, graft-versus-host disease (GVHD), and
10 autoimmune disorders, including type 1 diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis,
and lupus.

Background

The IL-7R complex is a heterodimeric receptor made up of the IL-7R alpha chain
15 (IL-7R α) and the common gamma chain (γ c) (Mazzucchelli et al., Nat Rev Immunol.,
2007, 7:144–54). IL-7R is bound by interleukin-7 (IL-7), a cytokine essential to the
development and homeostatic maintenance of T and B lymphocytes (Fry et al., J
Immunol., 2005, 174:6571–6). Binding of IL-7 to IL-7R activates multiple pathways that
regulate lymphocyte survival, glucose uptake, proliferation and differentiation.

20 IL-7R is expressed on both dendritic cells and monocytes and appears to act in
multiple hematopoietic lineages (Reche PA, et al., J Immunol., 2001, 167:336–43). In
dendritic cells, IL-7R plays an immunomodulatory role, whereas lymphocytes require
IL-7R signaling for survival, proliferation and differentiation. Both the Jak-Stat and
PI3K-Akt pathways are activated by the binding of IL-7 to IL-7R (Jian et al., Cytokine
25 Growth Factor Rev., 2005, 16:513-533). These pathways involve signaling crosstalk,
shared interaction domains, feedback loops, integrated gene regulation, multimerization
and ligand competition. Some targets of IL-7 signaling, including Bcl2 and Pyk2,
contribute to cellular survival. Other targets, such as PI3 kinase, src family kinases (lck
and fyn) and STAT5, contribute to cellular proliferation. The transcription factor STAT5
30 contributes to activation of multiple different downstream genes in B and T cells and
may contribute to VDJ recombination through alteration of chromatin structure. The cell
survival and cell proliferation signals induced by IL-7 combine to induce normal T cell
development. Details of the complex IL-7 signaling network and its interaction with

other signaling cascades in cells of the immune system have not yet been fully elucidated.

From the information available in the art, and prior to the present invention, it remained unclear whether the introduction of an antagonist IL-7R antibody into the blood circulation to selectively antagonize IL-7R would be effective to treat type 2 diabetes, type 1 diabetes, GVHD, lupus and rheumatoid arthritis, and, if so, what properties of an IL-7R antibody are needed for such *in vivo* effectiveness.

Summary

Antagonist antibodies that selectively interact with and inhibit IL-7R function are provided. It is demonstrated for the first time that certain antagonist IL-7R antibodies are effective *in vivo* to treat type 1 diabetes, type 2 diabetes, rheumatoid arthritis, GVHD and lupus.

In some embodiments, antagonist antibodies that selectively interact with and inhibit IL-7R function are provided. In some embodiments, the antibody specifically binds to IL-7R and comprises an antigen binding region that competes with a monoclonal antibody selected from the group consisting of C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a and HAL403b, for binding to IL-7R. In some embodiments, the antibody comprises a polypeptide having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 42 or SEQ ID NO: 43. In other embodiments, the antibody specifically binds to IL-7R and recognizes an epitope which overlaps an epitope of IL-7R that is recognized by a monoclonal antibody selected from the group consisting of C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a and HAL403b. In some embodiments, the antibody the antibody binds to an epitope comprising residues I82, K84, K100, T105, and Y192 of interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α). In some embodiments, the epitope further comprises one or more additional residues selected from the group consisting of residues D190, H191, and K194 of human IL-7R α .

In some embodiments, the IL-7R is human IL-7R.

In some embodiments, the antibody specifically binds to interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α) and comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence X_1X_2VMH , wherein X_1 is D or N; X_2 is S or Y (SEQ ID NO: 50), a VH CDR2 having the amino acid sequence $X_1X_2X_3X_4X_5GX_6X_7TYYADSVKG$, wherein X_1 is L or A; X_2 is V or I; X_3 is G or S; X_4 is W

or G; X₅ is D or S; X₆ is F, G or S; X₇ is F, A or S (SEQ ID NO: 51), and a VH CDR3 having the amino acid sequence X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈, wherein X₁ is Q or D; X₂ is G or I; X₃ is D or S; X₄ is Y or G; X₅ is M, V or G; X₆ is G or F; X₇ is N, D or M; X₈ is N, Y or D (SEQ ID NO: 52), a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence TX₁SSGX₂IX₃SSYVQ wherein X₁ is R or G; X₂ is S or R; X₃ is D or A (SEQ ID NO: 53), a VL CDR2 having the amino acid sequence EDX₁QRPS wherein X₁ is D or N (SEQ ID NO: 54), and a VL CDR3 having the amino acid sequence X₁X₂YX₃X₄X₅X₆LX₇ wherein X₁ is Q or M; X₂ is S or Q; X₃ is D or A; X₄ is F or S; X₅ is H or S; X₆ is H or S; X₇ is V or W (SEQ ID NO: 55), wherein the antibody blocks STAT5 phosphorylation in a STAT5 activation assay. In some embodiments, the framework region between VH CDR2 and VH CDR3 comprises the amino acid sequence alanine-arginine, wherein the arginine is adjacent to the first amino acid residue of VH CDR3. In some embodiments, the framework region between VH CDR2 and VH CDR3 comprises the amino acid sequence cysteine-alanine-arginine, wherein the arginine is adjacent to the first amino acid residue of VH CDR3.

In some embodiments, the antibody comprises a heavy chain CDR contact region one having the amino acid sequence X₁X₂VMH, wherein X₁ is D or N; X₂ is S or Y (SEQ ID NO: 50), a heavy chain CDR contact region two having the amino acid sequence GWDGFF (SEQ ID NO: 57), and a heavy chain CDR contact region three having the amino acid sequence ARX₁X₂X₃X₄ (SEQ ID NO: 58), a light chain CDR contact region one having the amino acid sequence SGSIDSSY (SEQ ID NO: 59), a light chain CDR contact region two having the amino acid sequence EDDQRPSGV (SEQ ID NO: 60), and a light chain CDR contact region three having the amino acid sequence FHHL (SEQ ID NO: 61), wherein the antibody blocks STAT5 phosphorylation in a STAT5 activation assay.

In some embodiments, the antibody specifically binds to IL-7R α and comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence DSVMH (SEQ ID NO: 19), GFTFDDS (SEQ ID NO: 46), or GFTFDDDSVMH (SEQ ID NO: 47), a VH CDR2 having the amino acid sequence LVGWDGFFTTYADSVKG (SEQ ID NO: 23) or GWDGFF (SEQ ID NO: 48), and a VH CDR3 having the amino acid sequence QGDYMGNN (SEQ ID NO: 49), or a variant thereof having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

In some embodiments, the antibody comprises a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29), a VL CDR2 having the amino acid sequence EDDQRPS (SEQ ID NO: 31), and/or VL CDR3 having the amino acid sequence QSYDFHHLV (SEQ ID NO: 36), or a variant thereof
 5 having one or more conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3. In some embodiments, the antibody further comprises a VH CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 19, 46 or 47, a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 23, or 48, and a VH CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 49, or a variant thereof having one or more
 10 conservative amino acid substitutions in CDR1, CDR2, and/or CDR3.

In some embodiments, the antibody specifically binds to IL-7R α and comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 19, 46 or 47, a VH CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 23, or 48, and a VH CDR3 having the
 15 amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 49, a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 29, a VL CDR2 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 31, and a VL CDR3 having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 36. In some embodiments, the VH region comprises the
 20 amino acid sequence
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWVSLVGWDG
 FFTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGT
 LTVSS (SEQ ID NO: 40) and the VL region comprises the amino acid sequence
 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSG
 VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID
 25 NO: 41). In some embodiments, the antibody comprises a light chain having the amino
 acid sequence
 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSG
 VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVLQPKAAPS
 VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKY
 30 AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 43) and a
 heavy chain having the amino acid sequence
 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWVSLVGWDG
 FFTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGT

VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT
5 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 42), with or without the C-
terminal lysine of SEQ ID NO: 42.

In some embodiments, the antibody can be a human antibody, a humanized
antibody, or a chimeric antibody. In some embodiments, the antibody is a monoclonal
10 antibody.

In some embodiments, the antibody comprises a constant region. In some
embodiments, the antibody is of the human IgG1 or IgG2Δa subclass. In some
embodiments, the antibody comprises a glycosylated constant region. In some
embodiments, the antibody comprises a constant region having increased binding
15 affinity to a human Fc gamma receptor.

In some embodiments, a pharmaceutical composition comprising an antibody
that selectively interacts with and inhibits IL-7R function is provided.

In some embodiments, a cell line that recombinantly produces an antibody that
selectively interacts with and inhibits IL-7R function is provided.

20 In some embodiments, a nucleic acid encoding an antibody that selectively
interacts with and inhibits IL-7R function is provided.

In some embodiments, methods of lowering blood glucose levels in an individual
are provided. In some embodiments, the method comprises administering a
therapeutically effective amount of an antagonist IL-7R antibody to an individual in need
25 of such treatment, thereby lowering blood glucose levels.

In some embodiments, methods of improving glucose tolerance in an individual
are provided. In some embodiments, the method comprises administering a
therapeutically effective amount of an antagonist IL-7R antibody to an individual in need
of such treatment, thereby improving glucose tolerance.

30 In some embodiments, methods of preventing or treating type 1 diabetes in an
individual are provided. In some embodiments, the method comprises administering a
therapeutically effective amount of an antagonist IL-7R antibody to an individual in need

of such treatment, thereby preventing or treating one or more symptoms of type 1 diabetes.

In some embodiments, methods of preventing or treating type 2 diabetes in an individual are provided. In some embodiments, the method comprises administering a therapeutically effective amount of an IL-7R antagonist to an individual in need of such treatment, thereby preventing or treating one or more symptoms of type 2 diabetes. In some embodiments, the IL-7R antagonist is an antagonist IL-7R antibody.

In some embodiments, methods of preventing or treating rheumatoid arthritis in an individual are provided. In some embodiments, the method comprises administering a therapeutically effective amount of an antagonist IL-7R antibody to an individual in need of such treatment, thereby preventing or treating one or more symptoms of rheumatoid arthritis.

In some embodiments, methods of preventing or treating graft-versus-host disease (GVHD) in an individual are provided. In some embodiments, the method comprises administering a therapeutically effective amount of an antagonist IL-7R antibody to an individual in need of such treatment, thereby preventing or treating one or more symptoms of GVHD.

In some embodiments, the GVHD is chronic GVHD or acute GVHD.

In some embodiments, methods of preventing or treating lupus in an individual are provided. In some embodiments, the method comprises administering a therapeutically effective amount of an antagonist IL-7R antibody to an individual in need of such treatment, thereby preventing or treating one or more symptoms of lupus.

In some embodiments, the lupus is cutaneous lupus erythematosus, systemic lupus erythematosus, drug-induced erythematosus or neonatal lupus.

In some embodiments, methods of preventing or treating multiple sclerosis in an individual are provided. In some embodiments, the method comprises administering a therapeutically effective amount of an antagonist IL-7R antibody to an individual in need of such treatment, thereby preventing or treating one or more symptoms of multiple sclerosis and reducing and/or depleting the naïve and/or activated T cell populations in the individual. In some embodiments, the reduced or depleted T cell populations in the individual comprise T_H1 and/or T_H17 cells. In some embodiments, administration of the antagonist IL-7R antibody does not result in expansion of T_H17 cell population in the individual.

In some embodiments, the antibody can be administered parenterally. In some embodiments, the individual is a human.

Brief Description of the Figures/Drawings

5 Figure 1 depicts the dose-dependent effect of antagonist IL-7R monoclonal antibodies P2D2, P2E11 and HAL403a on IL-7-mediated STAT5 phosphorylation in human peripheral blood mononuclear cell (PBMCs). The x-axis indicates the percentage of CD4⁺ cells expressing phospho-STAT5 (p-STAT).

10 Figure 2 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on development of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice.

 Figure 3 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on (A) blood glucose levels (mg/dL) and (B) body weight (g) in NOD mice.

15 Figure 4 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on (A) naïve CD8⁺ T cell and (B) memory CD8⁺ T cell populations in NOD mice. For the x-axis, the total CD8⁺ T cell population was set as 100%.

 Figure 5 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on naïve CD4⁺ T cell population in NOD mice. For the x-axis, the total CD4⁺ T cell population was set as 100%.

20 Figure 6 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibodies 28B6 and 28G9 on clinical severity of EAE animals. Clinical severity of EAE was assessed daily with a 0 to 5 point scoring system: 0, normal; 1, flaccid tail; 2, partial hind-limb paralysis; 3, total hind-limb paralysis; 4, quadriplegia; 5, moribund state or dead.

 Figure 7 depicts the dose-dependent effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on clinical severity of EAE animals.

25 Figure 8 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on clinical severity of EAE animals.

 Figure 9 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 in animals with established EAE.

30 Figure 10 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 at lower dose in animals with established EAE.

 Figure 11 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibodies 28G9 and 28B6 on (A) CD4 T cell and (B) CD8 T cell populations from bone marrow (BM), spleen,

blood and lymph nodes (LNs) of EAE animals. For the x-axis, the total lymphocyte population was set as 100%.

Figures 12A-C depict the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on (A) naive T cell, (B) memory T cell, and (C) activated T cell populations from bone marrow, spleen, blood and lymph nodes of EAE animals. For the x-axis, the CD8+ T cell population was set as 100%.

Figure 13 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on T_{eff} cell (left graph) and T_{reg} cell (right graph) populations from bone marrow, spleen, blood and lymph nodes of EAE animals. For the x-axis, the CD4+ T cell population was set as 100%. “*” indicates P<0.05 as compared to control.

Figure 14 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on blood glucose levels (mg/dL) in high fat diet-induced obesity (DIO) mice.

Figure 15 depicts the effect of antagonist IL-7R monoclonal antibody 28G9 on glucose intolerance in high fat diet-induced obesity (DIO) mice.

Detailed Description

Disclosed herein are antibodies that antagonize the function of IL-7R, including its interaction with IL-7. Methods of making antagonist IL-7R antibodies, compositions comprising these antibodies, and methods of using these antibodies as a medicament are provided. IL-7R antagonists, e.g., antagonist IL-7R antibodies, can be used to in the prevention and/or treatment of type 2 diabetes, GVHD and autoimmune disorders, including multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, and lupus.

General Techniques

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology (including recombinant techniques), microbiology, cell biology, biochemistry and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature, such as, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J.

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

Definitions

15 An "antibody" is an immunoglobulin molecule capable of specific binding to a target, such as a carbohydrate, polynucleotide, lipid, polypeptide, etc., through at least one antigen recognition site, located in the variable region of the immunoglobulin molecule. As used herein, the term encompasses not only intact polyclonal or monoclonal antibodies, but also fragments thereof (such as Fab, Fab', F(ab')₂, Fv),
20 single chain (ScFv) and domain antibodies (including, for example, shark and camelid antibodies), and fusion proteins comprising an antibody, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site. An antibody includes an antibody of any class, such as IgG, IgA, or IgM (or sub-class thereof), and the antibody need not be of any particular class. Depending on the
25 antibody amino acid sequence of the constant region of its heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2. The heavy-chain constant regions that correspond to the different classes of
30 immunoglobulins are called alpha, delta, epsilon, gamma, and mu, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

As used herein, "monoclonal antibody" refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being
5 directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations, which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies,
10 and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495, or may be made by recombinant DNA methods such as described in U.S. Pat. No. 4,816,567. The monoclonal antibodies may also be isolated
15 from phage libraries generated using the techniques described in McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554, for example.

As used herein, "humanized" antibody refers to forms of non-human (e.g. murine) antibodies that are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains, or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of
20 antibodies) that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Preferably, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some
25 instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, the humanized antibody may comprise residues that are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences, but are included to further refine and optimize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially
30 all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an

immunoglobulin constant region or domain (Fc), typically that of a human immunoglobulin. Preferred are antibodies having Fc regions modified as described in WO 99/58572. Other forms of humanized antibodies have one or more CDRs (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2, or CDR H3) which are altered with respect to the original antibody, which are also termed one or more CDRs "derived from" one or more CDRs from the original antibody.

As used herein, "human antibody" means an antibody having an amino acid sequence corresponding to that of an antibody produced by a human and/or which has been made using any of the techniques for making human antibodies known to those skilled in the art or disclosed herein. This definition of a human antibody includes antibodies comprising at least one human heavy chain polypeptide or at least one human light chain polypeptide. One such example is an antibody comprising murine light chain and human heavy chain polypeptides. Human antibodies can be produced using various techniques known in the art. In one embodiment, the human antibody is selected from a phage library, where that phage library expresses human antibodies (Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581). Human antibodies can also be made by immunization of animals into which human immunoglobulin loci have been transgenically introduced in place of the endogenous loci, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. This approach is described in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; and 5,661,016. Alternatively, the human antibody may be prepared by immortalizing human B lymphocytes that produce an antibody directed against a target antigen (such B lymphocytes may be recovered from an individual or may have been immunized *in vitro*). See, e.g., Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; and U.S. Patent No. 5,750,373.

As used herein, the term "IL-7R" refers to any form of IL-7R and variants thereof that retain at least part of the activity of IL-7R. Unless indicated differently, such as by specific reference to human IL-7R, IL-7R includes all mammalian species of native sequence IL-7R, e.g., human, canine, feline, equine, and bovine.

As used herein, an "IL-7R antagonist" refers to an antibody or molecule that is able to inhibit IL-7R biological activity and/or downstream pathway(s) mediated by IL-7R signaling, including binding to IL-7, phosphorylation of STAT5, Src kinases, PI3 kinase and Pyk2, and upregulation of Bcl2 protein. Examples of IL-7R antagonists include, without limitation, antagonist IL-7R antibodies, IL-7R siRNA, IL-7R shRNA, and IL-7R antisense oligonucleotides.

Antagonist IL-7R antibodies encompass antibodies that block, antagonize, suppress or reduce (to any degree including significantly) IL-7R biological activity, including downstream pathways mediated by IL-7R signaling, such interaction with IL-7 and/or elicitation of a cellular response to IL-7. For purpose of the present invention, it will be explicitly understood that the term "antagonist IL-7R antibody" (interchangeably termed "IL-7R antagonist antibody," "antagonist anti-IL-7R antibody" or "anti-IL-7R antagonist antibody") encompasses all the previously identified terms, titles, and functional states and characteristics whereby the IL-7R itself, an IL-7R biological activity (including but not limited to interaction with IL-7, its ability to mediate any aspect of phosphorylation of STAT5, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-Akt pathway activation, p27^{Kip1} downregulation, Bcl-2 upregulation, Rb hyperphosphorylation, and CXCR4 upregulation), or the consequences of the biological activity, are substantially nullified, decreased, or neutralized in any meaningful degree. In some embodiments, an antagonist IL-7R antibody binds IL-7R and prevents interaction with IL-7. Examples of antagonist IL-7R antibodies are provided herein.

As used herein a "full antagonist" is an antagonist which, at an effective concentration, essentially completely blocks a measurable effect of IL-7R. By a partial antagonist is meant an antagonist that is capable of partially blocking a measurable effect, but that, even at a highest concentration is not a full antagonist. By essentially completely is meant at least about 80%, preferably, at least about 90%, more preferably, at least about 95%, and most preferably, at least about 98% of the measurable effect is blocked.

The terms "polypeptide", "oligopeptide", "peptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to chains of amino acids of any length, preferably, relatively short (e.g., 10-100 amino acids). The chain may be linear or branched, it may comprise modified amino acids, and/or may be interrupted by non-amino acids. The terms also encompass an amino acid chain that has been modified naturally or by

intervention; for example, disulfide bond formation, glycosylation, lipidation, acetylation, phosphorylation, or any other manipulation or modification, such as conjugation with a labeling component. Also included within the definition are, for example, polypeptides containing one or more analogs of an amino acid (including, for example, unnatural amino acids, etc.), as well as other modifications known in the art. It is understood that the polypeptides can occur as single chains or associated chains.

As known in the art, "polynucleotide," or "nucleic acid," as used interchangeably herein, refer to chains of nucleotides of any length, and include DNA and RNA. The nucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, modified nucleotides or bases, and/or their analogs, or any substrate that can be incorporated into a chain by DNA or RNA polymerase. A polynucleotide may comprise modified nucleotides, such as methylated nucleotides and their analogs. If present, modification to the nucleotide structure may be imparted before or after assembly of the chain. The sequence of nucleotides may be interrupted by non-nucleotide components. A polynucleotide may be further modified after polymerization, such as by conjugation with a labeling component. Other types of modifications include, for example, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoamidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those containing pendant moieties, such as, for example, proteins (e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), those containing chelators (e.g., metals, radioactive metals, boron, oxidative metals, etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (e.g., alpha anomeric nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotide(s). Further, any of the hydroxyl groups ordinarily present in the sugars may be replaced, for example, by phosphonate groups, phosphate groups, protected by standard protecting groups, or activated to prepare additional linkages to additional nucleotides, or may be conjugated to solid supports. The 5' and 3' terminal OH can be phosphorylated or substituted with amines or organic capping group moieties of from 1 to 20 carbon atoms. Other hydroxyls may also be derivatized to standard protecting groups. Polynucleotides can also contain analogous forms of ribose or deoxyribose sugars that are generally known in the art, including, for example, 2'-O-methyl-, 2'-O-allyl, 2'-fluoro- or 2'-azido-ribose,

carbocyclic sugar analogs, alpha- or beta-anomeric sugars, epimeric sugars such as arabinose, xyloses or lyxoses, pyranose sugars, furanose sugars, sedoheptuloses, acyclic analogs and abasic nucleoside analogs such as methyl riboside. One or more phosphodiester linkages may be replaced by alternative linking groups. These
5 alternative linking groups include, but are not limited to, embodiments wherein phosphate is replaced by P(O)S("thioate"), P(S)S ("dithioate"), (O)NR₂ ("amidate"), P(O)R, P(O)OR', CO or CH₂ ("formacetal"), in which each R or R' is independently H or substituted or unsubstituted alkyl (1-20 C) optionally containing an ether (-O-) linkage, aryl, alkenyl, cycloalkyl, cycloalkenyl or araldyl. Not all linkages in a polynucleotide
10 need be identical. The preceding description applies to all polynucleotides referred to herein, including RNA and DNA.

A "variable region" of an antibody refers to the variable region of the antibody light chain or the variable region of the antibody heavy chain, either alone or in combination. As known in the art, the variable regions of the heavy and light chain each
15 consist of four framework regions (FR) connected by three complementarity determining regions (CDRs) also known as hypervariable regions. The CDRs in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the CDRs from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies. There are at least two techniques for determining CDRs: (1) an approach based on cross-species
20 sequence variability (i.e., Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); and (2) an approach based on crystallographic studies of antigen-antibody complexes (Al-lazikani et al., 1997, J. Molec. Biol. 273:927-948). As used herein, a CDR may refer to CDRs defined by either approach or by a combination of both approaches.

25 As known in the art a "constant region" of an antibody refers to the constant region of the antibody light chain or the constant region of the antibody heavy chain, either alone or in combination.

As used herein, an antibody "interacts with" IL-7R when the equilibrium dissociation constant is equal to or less than 20 nM, preferably less than about 6 nM,
30 more preferably less than about 1 nM, most preferably less than about 0.2 nM, as measured by the methods disclosed herein in Example 2.

An epitope that "preferentially binds" or "specifically binds" (used interchangeably herein) to an antibody or a polypeptide is a term well understood in the art, and methods

to determine such specific or preferential binding are also well known in the art. A molecule is said to exhibit "specific binding" or "preferential binding" if it reacts or associates more frequently, more rapidly, with greater duration and/or with greater affinity with a particular cell or substance than it does with alternative cells or substances. An antibody "specifically binds" or "preferentially binds" to a target if it binds with greater affinity, avidity, more readily, and/or with greater duration than it binds to other substances. For example, an antibody that specifically or preferentially binds to an IL-7R epitope is an antibody that binds this epitope with greater affinity, avidity, more readily, and/or with greater duration than it binds to other IL-7R epitopes or non-IL-7R epitopes. It is also understood that by reading this definition, for example, an antibody (or moiety or epitope) that specifically or preferentially binds to a first target may or may not specifically or preferentially bind to a second target. As such, "specific binding" or "preferential binding" does not necessarily require (although it can include) exclusive binding. Generally, but not necessarily, reference to binding means preferential binding.

As used herein, "substantially pure" refers to material which is at least 50% pure (i.e., free from contaminants), more preferably, at least 90% pure, more preferably, at least 95% pure, yet more preferably, at least 98% pure, and most preferably, at least 99% pure.

A "host cell" includes an individual cell or cell culture that can be or has been a recipient for vector(s) for incorporation of polynucleotide inserts. Host cells include progeny of a single host cell, and the progeny may not necessarily be completely identical (in morphology or in genomic DNA complement) to the original parent cell due to natural, accidental, or deliberate mutation. A host cell includes cells transfected in vivo with a polynucleotide(s) of this invention.

As known in the art, the term "Fc region" is used to define a C-terminal region of an immunoglobulin heavy chain. The "Fc region" may be a native sequence Fc region or a variant Fc region. Although the boundaries of the Fc region of an immunoglobulin heavy chain might vary, the human IgG heavy chain Fc region is usually defined to stretch from an amino acid residue at position Cys226, or from Pro230, to the carboxyl-terminus thereof. The numbering of the residues in the Fc region is that of the EU index as in Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991. The Fc region of an immunoglobulin generally comprises two constant regions, CH2 and CH3.

As used in the art, "Fc receptor" and "FcR" describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and FcγRIII subclasses, including allelic
5 variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, 1991, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:457-92; Capel et al., 1994, *Immunomethods*, 4:25-34; and de Haas et al., 1995, *J. Lab. Clin. Med.*,
10 126:330-41. "FcR" also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer et al., 1976, *J. Immunol.*, 117:587; and Kim et al., 1994, *J. Immunol.*, 24:249).

The term "compete", as used herein with regard to an antibody, means that a first antibody, or an antigen-binding portion thereof, binds to an epitope in a manner
15 sufficiently similar to the binding of a second antibody, or an antigen-binding portion thereof, such that the result of binding of the first antibody with its cognate epitope is detectably decreased in the presence of the second antibody compared to the binding of the first antibody in the absence of the second antibody. The alternative, where the binding of the second antibody to its epitope is also detectably decreased in the
20 presence of the first antibody, can, but need not be the case. That is, a first antibody can inhibit the binding of a second antibody to its epitope without that second antibody inhibiting the binding of the first antibody to its respective epitope. However, where each antibody detectably inhibits the binding of the other antibody with its cognate epitope or ligand, whether to the same, greater, or lesser extent, the antibodies are said
25 to "cross-compete" with each other for binding of their respective epitope(s). Both competing and cross-competing antibodies are encompassed by the present invention. Regardless of the mechanism by which such competition or cross-competition occurs (e.g., steric hindrance, conformational change, or binding to a common epitope, or portion thereof), the skilled artisan would appreciate, based upon the teachings provided
30 herein, that such competing and/or cross-competing antibodies are encompassed and can be useful for the methods disclosed herein.

A "functional Fc region" possesses at least one effector function of a native sequence Fc region. Exemplary "effector functions" include C1q binding; complement

dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; phagocytosis; down-regulation of cell surface receptors (e.g. B cell receptor), etc. Such effector functions generally require the Fc region to be combined with a binding domain (e.g. an antibody variable domain) and can be assessed using various assays known in the art for evaluating such antibody effector functions.

A "native sequence Fc region" comprises an amino acid sequence identical to the amino acid sequence of an Fc region found in nature. A "variant Fc region" comprises an amino acid sequence which differs from that of a native sequence Fc region by virtue of at least one amino acid modification, yet retains at least one effector function of the native sequence Fc region. In some embodiments, the variant Fc region has at least one amino acid substitution compared to a native sequence Fc region or to the Fc region of a parent polypeptide, e.g. from about one to about ten amino acid substitutions, and preferably, from about one to about five amino acid substitutions in a native sequence Fc region or in the Fc region of the parent polypeptide. The variant Fc region herein will preferably possess at least about 80% sequence identity with a native sequence Fc region and/or with an Fc region of a parent polypeptide, and most preferably, at least about 90% sequence identity therewith, more preferably, at least about 95%, at least about 96%, at least about 97%, at least about 98%, at least about 99% sequence identity therewith.

As used herein, "treatment" is an approach for obtaining beneficial or desired clinical results. For purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, one or more of the following: enhancement of glucose clearance, lowering blood glucose levels, improving glucose tolerance, reducing incidence of high blood glucose levels resulting from type 1 or type 2 diabetes, reducing incidence or amelioration of one or more symptoms of rheumatoid arthritis, reducing incidence or amelioration of one or more symptoms of GVHD, reducing incidence or amelioration of one or more symptoms of lupus, and reducing incidence or amelioration of one or more symptoms of multiple sclerosis.

"Reducing incidence" means any of reducing severity (which can include reducing need for and/or amount of (e.g., exposure to) other drugs and/or therapies generally used for this condition. As is understood by those skilled in the art, individuals may vary in terms of their response to treatment, and, as such, for example, a "method of reducing incidence" reflects administering the IL-7R antagonist based on a

reasonable expectation that such administration may likely cause such a reduction in incidence in that particular individual.

"Ameliorating" means a lessening or improvement of one or more symptoms as compared to not administering an IL-7R antagonist. "Ameliorating" also includes
5 shortening or reduction in duration of a symptom.

As used herein, an "effective dosage" or "effective amount" of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to effect any one or more beneficial or desired results. For prophylactic use, beneficial or desired results include eliminating or reducing the risk, lessening the severity, or delaying the outset of the disease,
10 including biochemical, histological and/or behavioral symptoms of the disease, its complications and intermediate pathological phenotypes presenting during development of the disease. For therapeutic use, beneficial or desired results include clinical results such as reducing blood glucose levels, reducing incidence or amelioration of one or more symptoms of type 1 diabetes, type 2 diabetes, rheumatoid arthritis, GVHD, lupus
15 or multiple sclerosis, decreasing the dose of other medications required to treat the disease, enhancing the effect of another medication, and/or delaying the progression of the disease of patients. An effective dosage can be administered in one or more administrations. For purposes of this invention, an effective dosage of drug, compound, or pharmaceutical composition is an amount sufficient to accomplish prophylactic or
20 therapeutic treatment either directly or indirectly. As is understood in the clinical context, an effective dosage of a drug, compound, or pharmaceutical composition may or may not be achieved in conjunction with another drug, compound, or pharmaceutical composition. Thus, an "effective dosage" may be considered in the context of administering one or more therapeutic agents, and a single agent may be considered to
25 be given in an effective amount if, in conjunction with one or more other agents, a desirable result may be or is achieved.

An "individual" or a "subject" is a mammal, more preferably, a human. Mammals also include, but are not limited to, farm animals, sport animals, pets, primates, horses, dogs, cats, mice and rats.

30 As used herein, "vector" means a construct, which is capable of delivering, and, preferably, expressing, one or more gene(s) or sequence(s) of interest in a host cell. Examples of vectors include, but are not limited to, viral vectors, naked DNA or RNA expression vectors, plasmid, cosmid or phage vectors, DNA or RNA expression vectors

associated with cationic condensing agents, DNA or RNA expression vectors encapsulated in liposomes, and certain eukaryotic cells, such as producer cells.

As used herein, "expression control sequence" means a nucleic acid sequence that directs transcription of a nucleic acid. An expression control sequence can be a promoter, such as a constitutive or an inducible promoter, or an enhancer. The expression control sequence is operably linked to the nucleic acid sequence to be transcribed.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" or "pharmaceutical acceptable excipient" includes any material which, when combined with an active ingredient, allows the ingredient to retain biological activity and is non-reactive with the subject's immune system. Examples include, but are not limited to, any of the standard pharmaceutical carriers such as a phosphate buffered saline solution, water, emulsions such as oil/water emulsion, and various types of wetting agents. Preferred diluents for aerosol or parenteral administration are phosphate buffered saline (PBS) or normal (0.9%) saline. Compositions comprising such carriers are formulated by well known conventional methods (see, for example, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; and Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000).

The term " k_{on} ", as used herein, refers to the rate constant for association of an antibody to an antigen. Specifically, the rate constants (k_{on} and k_{off}) and equilibrium dissociation constants are measured using Fab antibody fragments (i.e. univalent) and IL-7R.

The term " k_{off} ", as used herein, refers to the rate constant for dissociation of an antibody from the antibody/antigen complex.

The term " K_D ", as used herein, refers to the equilibrium dissociation constant of an antibody-antigen interaction.

Reference to "about" a value or parameter herein includes (and describes) embodiments that are directed to that value or parameter per se. For example, description referring to "about X" includes description of "X." Numeric ranges are inclusive of the numbers defining the range.

It is understood that wherever embodiments are described herein with the language "comprising," otherwise analogous embodiments described in terms of "consisting of" and/or "consisting essentially of" are also provided.

Where aspects or embodiments of the invention are described in terms of a Markush group or other grouping of alternatives, the present invention encompasses not only the entire group listed as a whole, but each member of the group individually and all possible subgroups of the main group, but also the main group absent one or more of the group members. The present invention also envisages the explicit exclusion of one or more of any of the group members in the claimed invention.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. Throughout this specification and claims, the word "comprise," or variations such as "comprises" or "comprising" will be understood to imply the inclusion of a stated integer or group of integers but not the exclusion of any other integer or group of integers. Unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular.

Exemplary methods and materials are described herein, although methods and materials similar or equivalent to those described herein can also be used in the practice or testing of the present invention. The materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Methods for preventing or treating type 2 diabetes, GVHD and autoimmune disorders

In one aspect, the invention provides a method for treating or preventing type 2 diabetes in an individual comprising administering to the individual an effective amount of an IL-7R antagonist such as, for example, an antagonist IL-7R antibody. In another aspect, the invention provides a method for treating or preventing an autoimmune disease, such as type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, lupus or multiple sclerosis, in an individual, the method comprising administering to the individual an effective amount of an IL-7R antagonist. In another aspect, the invention provides a method for treating or preventing GVHD in an individual comprising administering to the individual an effective amount of an IL-7R antagonist.

In some embodiments, therapeutic administration of the IL-7R antagonist advantageously results in lower blood glucose level and improved glucose tolerance. In other embodiments, therapeutic administration of the IL-7R antagonist advantageously maintains blood glucose at desirable levels.

In some embodiments, therapeutic administration of the IL-7R antagonist advantageously results in reduced incidence and/or amelioration of one or more symptoms of rheumatoid arthritis including, for example without limitation, joint stiffness, joint swelling, joint pain, and joint redness and warmth.

5 In some embodiments, therapeutic administration of the IL-7R antagonist advantageously results in reduced incidence and/or amelioration of one or more symptoms of lupus including, for example without limitation, fatigue, fever, weight loss, weight gain, joint pain, joint stiffness, joint swelling, malar rash, skin lesions, mouth sores, nose ulcers, hair loss, Raynaud's phenomenon, shortness of breath, chest pain,
10 dry eyes, bruising, anxiety, depression and memory loss.

In some embodiments, therapeutic administration of the IL-7R antagonist advantageously results in reduced incidence and/or amelioration of one or more symptoms of multiple sclerosis including, for example without limitation, limb paralysis, tremors, difficulty walking, swallowing difficulties, blindness, blurring vision, and muscle
15 weakness.

In some embodiments, therapeutic administration of the IL-7R antagonist advantageously results in reduced incidence and/or amelioration of one or more symptoms of GVHD including, for example without limitation, abdominal pain, abdominal cramps, fever, jaundice, skin rash, vomiting, weight loss, dry eyes, dry mouth, hair loss,
20 hepatitis, lung disorders, and digestive tract disorders.

In some embodiments, therapeutic administration of the IL-7R antagonist advantageously results in reduced incidence and/or amelioration of one or more symptoms of acute GVHD including, for example without limitation, pneumonitis, intestinal inflammation, diarrhea, abdominal pain, abdominal cramps, fever, jaundice,
25 nausea, vomiting, liver damage, skin rash, skin damage, damage to the mucosa, sloughing of the mucosal membrane, damage to the gastrointestinal tract, weight loss, maculopapular rash, elevated bilirubin levels, morbidity and mortality.

In some embodiments, therapeutic administration of the IL-7R antagonist advantageously results in reduced incidence and/or amelioration of one or more
30 symptoms of chronic GVHD including, for example without limitation, dry eyes, dry mouth, hair loss, hepatitis, lung disorders, digestive tract disorders, skin rash, oral ulcer, oral atrophy, onchodystrophy, sicca syndrome, sclerosis, lichen-planus-like lesions, poikiloderma, esophageal webs, fasciitis and bronchiolitis obliterans, and damage to the

liver, skin and mucosa, connective tissue, exocrine glands and/or the gastrointestinal tract.

A diabetic individual requiring lower blood glucose levels can be treated with an IL-7R antagonist such as, for example, an antagonist IL-7R antibody. An individual
5 suitable for antibody therapy is selected using clinical criteria and prognostic indicators of diabetes that are well known in the art. An individual at risk of developing diabetes as assessed by known prognostic indicators such as family history, fasting blood glucose levels, or decreased glucose tolerance also warrants administration of an IL-7R antagonist. One skilled in the art would recognize or know how to diagnose an
10 individual with diabetes or dysregulated glucose uptake and, depending upon the degree or severity of the disease, can make the appropriate determination of when to administer the antibody and can also select the most desirable mode of administration.

An individual suffering from rheumatoid arthritis can be treated with an IL-7R antagonist such as, for example, an antagonist IL-7R antibody. An individual suitable
15 for IL-7R antagonist therapy is selected using clinical criteria and prognostic indicators of rheumatoid arthritis that are well known in the art. Diagnosis or assessment of rheumatoid arthritis is well-established in the art. Assessment of severity may be performed based on measures known in the art, such as the rheumatoid arthritis severity scale (RASS). Bardwell et al., Rheumatology, 2002, 41:38-45. In some
20 embodiments, ameliorating, controlling, reducing incidence of, or delaying the development or progression of rheumatoid arthritis and/or symptoms of rheumatoid arthritis is measured by RASS.

An individual suffering from lupus can be treated with an IL-7R antagonist such as, for example, an antagonist IL-7R antibody. An individual suitable for IL-7R
25 antagonist therapy is selected using clinical criteria and prognostic indicators of lupus that are well known in the art. One skilled in the art would recognize or know how to diagnose an individual with lupus and, depending upon the degree or severity of the disease, can make the appropriate determination of when to administer the IL-7R antagonist and can also select the most desirable mode of administration.

30 An individual suffering from multiple sclerosis can be treated with an IL-7R antagonist such as, for example, an antagonist IL-7R antibody. An individual suitable for IL-7R antagonist therapy is selected using clinical criteria and prognostic indicators of multiple sclerosis that are well known in the art. An individual at risk of developing

multiple sclerosis as assessed by known prognostic indicators such as family history or symptom history also warrants administration of an IL-7R antagonist. One skilled in the art would recognize or know how to diagnose an individual with multiple sclerosis and, depending upon the degree or severity of the disease, can make the appropriate determination of when to administer the IL-7R antagonist and can also select the most desirable mode of administration.

An individual suffering from GVHD can be treated with an IL-7R antagonist such as, for example, an antagonist IL-7R antibody. An individual suitable for IL-7R antagonist therapy is selected using clinical criteria and prognostic indicators of GVHD that are well known in the art. Diagnosis or assessment of GVHD is well-established in the art. Tests for GVHD usually depend on the symptoms, but may include gastrointesting endoscopy, with or without a biopsy, liver functions tests (AST, ALP, and bilirubin levels will be increased), livery biopsy, lung x-rays, and/or skin biopsy. Features sufficient to establish the diagnosis of chronic GVHD include, for example without limitation, sclerosis, lichen-planus-like lesions, poikiloderma, esophageal webs, fasciitis and bronchiolitis obliterans (see, e.g., Leet and Flowers, Hematology, January 2008; 2008:134-141). Acute liver GVHD may be measured by, for example, the bilirubin level in acute patients. Acute skin GVHD may result in a diffuse maculopapular rash. Assessment of GVHD severity may be performed based on measures known in the art. In some embodiments, ameliorating, controlling, reducing incidence of, or delaying the development or progression of GVHD and/or symptoms of GVHD is measured by overall grade (skin-liver-gut) with each organ staged individually from a low of 1 to a high of 4. In some embodiments, ameliorating, controlling, reducing incidence of, or delaying the development or progression of GVHD and/or symptoms of GVHD is measured by monitoring body weight.

With respect to all methods described herein, reference to IL-7R antagonists also includes compositions comprising one or more additional agents. These compositions may further comprise suitable excipients, such as pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art. The present invention can be used alone or in combination with other conventional methods of treatment.

The IL-7R antagonist can be administered to an individual via any suitable route. It should be apparent to a person skilled in the art that the examples described herein are not intended to be limiting but to be illustrative of the techniques available.

Accordingly, in some embodiments, the IL-7R antagonist is administered to an individual in accord with known methods, such as intravenous administration, e.g., as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, transdermal, subcutaneous, intra-articular, sublingually, intrasynovial, via insufflation, intrathecal, oral, inhalation or topical routes. Administration can be systemic, e.g., intravenous administration, or localized. Commercially available nebulizers for liquid formulations, including jet nebulizers and ultrasonic nebulizers are useful for administration. Liquid formulations can be directly nebulized and lyophilized powder can be nebulized after reconstitution. Alternatively, an IL-7R antagonist can be aerosolized using a fluorocarbon formulation and a metered dose inhaler, or inhaled as a lyophilized and milled powder.

In one embodiment, an IL-7R antagonist is administered via site-specific or targeted local delivery techniques. Examples of site-specific or targeted local delivery techniques include various implantable depot sources of the IL-7R antagonist or local delivery catheters, such as infusion catheters, indwelling catheters, or needle catheters, synthetic grafts, adventitial wraps, shunts and stents or other implantable devices, site specific carriers, direct injection, or direct application. See, e.g., PCT Publication No. WO 00/53211 and U.S. Patent No. 5,981,568.

Various formulations of an IL-7R antagonist may be used for administration. In some embodiments, the IL-7R antagonist may be administered neat. In some embodiments, IL-7R antagonist and a pharmaceutically acceptable excipient may be in various formulations. Pharmaceutically acceptable excipients are known in the art, and are relatively inert substances that facilitate administration of a pharmacologically effective substance. For example, an excipient can give form or consistency, or act as a diluent. Suitable excipients include but are not limited to stabilizing agents, wetting and emulsifying agents, salts for varying osmolarity, encapsulating agents, buffers, and skin penetration enhancers. Excipients as well as formulations for parenteral and nonparenteral drug delivery are set forth in Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000.

In some embodiments, these agents are formulated for administration by injection (e.g., intraperitoneally, intravenously, subcutaneously, intramuscularly, etc.). Accordingly, these agents can be combined with pharmaceutically acceptable vehicles such as saline, Ringer's solution, dextrose solution, and the like. The particular dosage

regimen, i.e., dose, timing and repetition, will depend on the particular individual and that individual's medical history.

An IL-7R antagonist can be administered using any suitable method, including by injection (e.g., intraperitoneally, intravenously, subcutaneously, intramuscularly, etc.).

5 IL-7R antibodies can also be administered via inhalation, as described herein. Generally, for administration of IL-7R antibodies, an initial candidate dosage can be about 2 mg/kg. For the purpose of the present invention, a typical daily dosage might range from about any of 3 µg/kg to 30 µg/kg to 300 µg/kg to 3 mg/kg, to 30 mg/kg, to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For example, dosage

10 of about 1 mg/kg, about 2.5 mg/kg, about 5 mg/kg, about 10 mg/kg, and about 25 mg/kg may be used. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of symptoms occurs or until sufficient therapeutic levels are achieved, for example, to reduce blood glucose levels. An exemplary dosing regimen comprises administering an initial dose of about 2

15 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 1 mg/kg of the IL-7R antibody, or followed by a maintenance dose of about 1 mg/kg every other week. However, other dosage regimens may be useful, depending on the pattern of pharmacokinetic decay that the practitioner wishes to achieve. For example, in some embodiments, dosing from one to four times a week is contemplated. In other embodiments dosing once a

20 month or once every other month or every three months is contemplated. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays. The dosing regimen (including the IL-7R antagonist(s) used) can vary over time.

For the purpose of the present invention, the appropriate dosage of an IL-7R antagonist will depend on the IL-7R antagonist (or compositions thereof) employed, the

25 type and severity of symptoms to be treated, whether the agent is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the agent, the patient's clearance rate for the administered agent, and the discretion of the attending physician. Typically the clinician will administer an IL-7R antagonist until a dosage is reached that achieves the desired result. Dose and/or

30 frequency can vary over course of treatment. Empirical considerations, such as the half-life, generally will contribute to the determination of the dosage. For example, antibodies that are compatible with the human immune system, such as humanized antibodies or fully human antibodies, may be used to prolong half-life of the antibody

and to prevent the antibody being attacked by the host's immune system. Frequency of administration may be determined and adjusted over the course of therapy, and is generally, but not necessarily, based on treatment and/or suppression and/or amelioration and/or delay of symptoms, e.g., high blood glucose levels, joint pain, etc.

5 Alternatively, sustained continuous release formulations of antagonist IL-7R antibodies may be appropriate. Various formulations and devices for achieving sustained release are known in the art.

In one embodiment, dosages for an IL-7R antagonist may be determined empirically in individuals who have been given one or more administration(s) of an IL-7R antagonist. Individuals are given incremental dosages of an IL-7R antagonist. To
10 assess efficacy, an indicator of the disease can be followed.

Administration of an IL-7R antagonist in accordance with the method in the present invention can be continuous or intermittent, depending, for example, upon the recipient's physiological condition, whether the purpose of the administration is
15 therapeutic or prophylactic, and other factors known to skilled practitioners. The administration of an IL-7R antagonist may be essentially continuous over a preselected period of time or may be in a series of spaced doses.

In some embodiments, more than one IL-7R antagonist may be present. At least one, at least two, at least three, at least four, at least five different, or more IL-7R
20 antagonists can be present. Generally, those IL-7R antagonists may have complementary activities that do not adversely affect each other. For example, one or more of the following IL-7R antagonists may be used: an antagonist IL-7R antibody, an anti-sense molecule directed to an IL-7R (including an anti-sense molecule directed to a nucleic acid encoding IL-7R), an IL-7R inhibitory compound, and an IL-7R structural
25 analog. An IL-7R antagonist can also be used in conjunction with other agents that serve to enhance and/or complement the effectiveness of the agents.

Therapeutic formulations of the IL-7R antagonist used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing an antibody having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or
30 stabilizers (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and may comprise buffers such as phosphate, citrate,

and other organic acids; salts such as sodium chloride; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens, such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEENTM, PLURONICSTM or polyethylene glycol (PEG).

Liposomes containing the IL-7R antagonist are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688, 1985; Hwang, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030, 1980; and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556. Particularly useful liposomes can be generated by the reverse phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g. films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or 'poly(vinylalcohol)),

polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and 7 ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOTTM (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), sucrose acetate isobutyrate, and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by, for example, filtration through sterile filtration membranes. Therapeutic IL-7R antagonist compositions are generally placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

The compositions according to the present invention may be in unit dosage forms such as tablets, pills, capsules, powders, granules, solutions or suspensions, or suppositories, for oral, parenteral or rectal administration, or administration by inhalation or insufflation.

For preparing solid compositions such as tablets, the principal active ingredient is mixed with a pharmaceutical carrier, e.g. conventional tableting ingredients such as corn starch, lactose, sucrose, sorbitol, talc, stearic acid, magnesium stearate, dicalcium phosphate or gums, and other pharmaceutical diluents, e.g. water, to form a solid preformulation composition containing a homogeneous mixture of a compound of the present invention, or a non-toxic pharmaceutically acceptable salt thereof. When referring to these preformulation compositions as homogeneous, it is meant that the active ingredient is dispersed evenly throughout the composition so that the composition may be readily subdivided into equally effective unit dosage forms such as tablets, pills and capsules. This solid preformulation composition is then subdivided into unit dosage forms of the type described above containing from 0.1 to about 500 mg of the active ingredient of the present invention. The tablets or pills of the novel composition can be coated or otherwise compounded to provide a dosage form affording the advantage of prolonged action. For example, the tablet or pill can comprise an inner dosage and an outer dosage component, the latter being in the form of an envelope over the former. The two components can be separated by an enteric layer that serves to resist disintegration in the stomach and permits the inner component to pass intact into the duodenum or to be delayed in release. A variety of materials can be used for such enteric layers or coatings, such materials including a number of polymeric acids and

mixtures of polymeric acids with such materials as shellac, cetyl alcohol and cellulose acetate.

Suitable surface-active agents include, in particular, non-ionic agents, such as polyoxyethylenesorbitans (e.g. TweenTM 20, 40, 60, 80 or 85) and other sorbitans (e.g. SpanTM 20, 40, 60, 80 or 85). Compositions with a surface-active agent will conveniently comprise between 0.05 and 5% surface-active agent, and can be between 0.1 and 2.5%. It will be appreciated that other ingredients may be added, for example mannitol or other pharmaceutically acceptable vehicles, if necessary.

Suitable emulsions may be prepared using commercially available fat emulsions, such as IntralipidTM, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM and LipiphysanTM. The active ingredient may be either dissolved in a pre-mixed emulsion composition or alternatively it may be dissolved in an oil (e.g. soybean oil, safflower oil, cottonseed oil, sesame oil, corn oil or almond oil) and an emulsion formed upon mixing with a phospholipid (e.g. egg phospholipids, soybean phospholipids or soybean lecithin) and water. It will be appreciated that other ingredients may be added, for example glycerol or glucose, to adjust the tonicity of the emulsion. Suitable emulsions will typically contain up to 20% oil, for example, between 5 and 20%. The fat emulsion can comprise fat droplets between 0.1 and 1.0 μm , particularly 0.1 and 0.5 μm , and have a pH in the range of 5.5 to 8.0.

The emulsion compositions can be those prepared by mixing an IL-7R antagonist with IntralipidTM or the components thereof (soybean oil, egg phospholipids, glycerol and water).

Compositions for inhalation or insufflation include solutions and suspensions in pharmaceutically acceptable, aqueous or organic solvents, or mixtures thereof, and powders. The liquid or solid compositions may contain suitable pharmaceutically acceptable excipients as set out above. In some embodiments, the compositions are administered by the oral or nasal respiratory route for local or systemic effect. Compositions in preferably sterile pharmaceutically acceptable solvents may be nebulised by use of gases. Nebulised solutions may be breathed directly from the nebulising device or the nebulising device may be attached to a face mask, tent or intermittent positive pressure breathing machine. Solution, suspension or powder compositions may be administered, preferably orally or nasally, from devices which deliver the formulation in an appropriate manner.

IL-7R antagonists

The methods of the invention use an IL-7R antagonist, which refers to any protein, peptide or nucleic acid molecule that blocks, suppresses or reduces (including
5 significantly reduces) IL-7R biological activity, including downstream pathways mediated by IL-7R signaling, such as elicitation of a cellular response to IL-7R. Examples of IL-7R antagonists include, without limitation, antagonist IL-7R antibodies, IL-7R siRNA, IL-7R shRNA, and IL-7R antisense oligonucleotides.

An IL-7R antagonist should exhibit any one or more of the following
10 characteristics: (a) bind to IL-7R; (b) block IL-7R interaction with IL-7; (c) block or decrease IL-7-mediated STAT5 phosphorylation; (d) decrease blood glucose levels *in vivo*; (e) increase glucose tolerance *in vivo*; (f) reduce disease severity in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE); (g) block or decrease PI3K phosphorylation; (h) block or decrease AKT phosphorylation; and (i) block IL-7R interaction with other yet to
15 be identified factors.

In some embodiments, the IL-7R antagonist is an antagonist IL-7R antibody. For purposes of this invention, the antagonist IL-7R antibody preferably reacts with IL-7R α in a manner that inhibits IL-7R signaling function and IL-7 interaction. In some
20 embodiments, the antagonist IL-7R antibody specifically recognizes primate IL-7R. In some embodiments, the antagonist IL-7R antibody binds primate and rodent IL-7R.

The antibodies useful in the present invention can encompass monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, antibody fragments (e.g., Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), chimeric antibodies, bispecific antibodies, heteroconjugate antibodies, single chain (ScFv), mutants thereof, fusion proteins comprising an antibody portion (e.g., a domain
25 antibody), humanized antibodies, and any other modified configuration of the immunoglobulin molecule that comprises an antigen recognition site of the required specificity, including glycosylation variants of antibodies, amino acid sequence variants of antibodies, and covalently modified antibodies. The antibodies may be murine, rat, human, or any other origin (including chimeric or humanized antibodies).

30 In some embodiments, the antagonist IL-7R antibody is a monoclonal antibody. The antagonist IL-7R antibody can also be humanized. In other embodiments, the antibody is human.

In some embodiments, the antibody comprises a modified constant region, such as, for example without limitation, a constant region that has increased potential for provoking an immune response. For example, the constant region may be modified to have increased affinity to an Fc gamma receptor such as, e.g., FcγRI or FcγRIIA.

5 In some embodiments, the antibody comprises a modified constant region, such as a constant region that is immunologically inert, that is, having a reduced potential for provoking an immune response. In some embodiments, the constant region is modified as described in Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624; PCT Application No. PCT/GB99/01441; and/or UK Patent Application No. 9809951.8. The Fc can be human
10 human IgG1, human IgG2 or human IgG4. The Fc can be human IgG2 containing the mutation A330P331 to S330S331 (IgG2Δa), in which the amino acid residues are numbered with reference to the wild type IgG2 sequence. Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624. In some embodiments, the antibody comprises a constant region of IgG₄ comprising the following mutations (Armour et al., 2003, Molecular Immunology 40 585-
15 593): E233F234L235 to P233V234A235 (IgG4Δc), in which the numbering is with reference to wild type IgG4. In yet another embodiment, the Fc is human IgG4 E233F234L235 to P233V234A235 with deletion G236 (IgG4Δb). In another embodiment the Fc is any human IgG4 Fc (IgG4, IgG4Δb or IgG4Δc) containing hinge stabilizing mutation S228 to P228 (Aalberse et al., 2002, Immunology 105, 9-19). In another
20 embodiment, the Fc can be aglycosylated Fc.

In some embodiments, the constant region is aglycosylated by mutating the oligosaccharide attachment residue (such as Asn297) and/or flanking residues that are part of the glycosylation recognition sequence in the constant region. In some
25 embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically. The constant region may be aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically or by expression in a glycosylation deficient host cell.

The binding affinity (K_D) of an antagonist IL-7R antibody to IL-7R (such as human IL-7R) can be about 0.002 to about 200 nM. In some embodiments, the binding affinity is any of about 200 nM, about 100 nM, about 50 nM, about 10 nM, about 1 nM, about
30 500 pM, about 100 pM, about 60 pM, about 50 pM, about 20 pM, about 15 pM, about 10 pM, about 5 pM, or about 2 pM. In some embodiments, the binding affinity is less than any of about 250 nM, about 200 nM, about 100 nM, about 50 nM, about 10 nM, about 1

nM, about 500 pM, about 100 pM, about 50 pM, about 20 pM, about 10 pM, about 5 pM, or about 2 pM.

One way of determining binding affinity of antibodies to IL-7R is by measuring binding affinity of monofunctional Fab fragments of the antibody. To obtain
5 monofunctional Fab fragments, an antibody (for example, IgG) can be cleaved with papain or expressed recombinantly. The affinity of an IL-7R Fab fragment of an antibody can be determined by surface plasmon resonance (Biacore™3000™ surface plasmon resonance (SPR) system, Biacore™, INC, Piscataway NJ) equipped with pre-immobilized streptavidin sensor chips (SA) using HBS-EP running buffer (0.01M
10 HEPES, pH 7.4, 0.15 NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20). Biotinylated human IL-7R (or any other IL-7R) can be diluted into HBS-EP buffer to a concentration of less than 0.5 µg/mL and injected across the individual chip channels using variable contact times, to achieve two ranges of antigen density, either 50-200 response units (RU) for detailed kinetic studies or 800-1,000 RU for screening assays. Regeneration
15 studies have shown that 25 mM NaOH in 25% v/v ethanol effectively removes the bound Fab while keeping the activity of IL-7R on the chip for over 200 injections. Typically, serial dilutions (spanning concentrations of 0.1-10x estimated K_D) of purified Fab samples are injected for 1 min at 100 µL/minute and dissociation times of up to 2 hours are allowed. The concentrations of the Fab proteins are determined by ELISA
20 and/or SDS-PAGE electrophoresis using a Fab of known concentration (as determined by amino acid analysis) as a standard. Kinetic association rates (k_{on}) and dissociation rates (k_{off}) are obtained simultaneously by fitting the data globally to a 1:1 Langmuir binding model (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) using the BIAevaluation program. Equilibrium dissociation
25 constant (K_D) values are calculated as k_{off}/k_{on} . This protocol is suitable for use in determining binding affinity of an antibody to any IL-7R, including human IL-7R, IL-7R of another mammal (such as mouse IL-7R, rat IL-7R, primate IL-7R), as well as different forms of IL-7R. Binding affinity of an antibody is generally measured at 25°C, but can also be measured at 37°C.

30 The antagonist IL-7R antibodies may be made by any method known in the art, including the method as provided in Example 1. For the production of hybridoma cell lines, the route and schedule of immunization of the host animal are generally in keeping with established and conventional techniques for antibody stimulation and

production, as further described herein. General techniques for production of human and mouse antibodies are known in the art and/or are described herein.

It is contemplated that any mammalian subject including humans or antibody producing cells therefrom can be manipulated to serve as the basis for production of mammalian, including human, hybridoma cell lines. Typically, the host animal is inoculated intraperitoneally, intramuscularly, orally, subcutaneously, intraplantar, and/or intradermally with an amount of immunogen, including as described herein.

Hybridomas can be prepared from the lymphocytes and immortalized myeloma cells using the general somatic cell hybridization technique of Kohler, B. and Milstein, C., 1975, *Nature* 256:495-497 or as modified by Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381, 1982. Available myeloma lines, including but not limited to X63-Ag8.653 and those from the Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA, may be used in the hybridization. Generally, the technique involves fusing myeloma cells and lymphoid cells using a fusogen such as polyethylene glycol, or by electrical means well known to those skilled in the art. After the fusion, the cells are separated from the fusion medium and grown in a selective growth medium, such as hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) medium, to eliminate unhybridized parent cells. Any of the media described herein, supplemented with or without serum, can be used for culturing hybridomas that secrete monoclonal antibodies. As another alternative to the cell fusion technique, EBV immortalized B cells may be used to produce the IL-7R monoclonal antibodies of the subject invention. The hybridomas are expanded and subcloned, if desired, and supernatants are assayed for anti-immunogen activity by conventional immunoassay procedures (e.g., radioimmunoassay, enzyme immunoassay, or fluorescence immunoassay).

Hybridomas that may be used as source of antibodies encompass all derivatives, progeny cells of the parent hybridomas that produce monoclonal antibodies specific for IL-7R, or a portion thereof.

Hybridomas that produce such antibodies may be grown in vitro or in vivo using known procedures. The monoclonal antibodies may be isolated from the culture media or body fluids, by conventional immunoglobulin purification procedures such as ammonium sulfate precipitation, gel electrophoresis, dialysis, chromatography, and ultrafiltration, if desired. Undesired activity, if present, can be removed, for example, by running the preparation over adsorbents made of the immunogen attached to a solid

phase and eluting or releasing the desired antibodies off the immunogen. Immunization of a host animal with a human IL-7R α , or a fragment containing the target amino acid sequence conjugated to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, e.g., keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl₂, or R¹N=C=NR, where R and R¹ are different alkyl groups, can yield a population of antibodies (e.g., monoclonal antibodies).

If desired, the antagonist IL-7R antibody (monoclonal or polyclonal) of interest may be sequenced and the polynucleotide sequence may then be cloned into a vector for expression or propagation. The sequence encoding the antibody of interest may be maintained in vector in a host cell and the host cell can then be expanded and frozen for future use. Production of recombinant monoclonal antibodies in cell culture can be carried out through cloning of antibody genes from B cells by means known in the art. See, e.g. Tiller et al., 2008, J. Immunol. Methods 329, 112; US Patent No. 7,314,622.

In an alternative, the polynucleotide sequence may be used for genetic manipulation to "humanize" the antibody or to improve the affinity, or other characteristics of the antibody. For example, the constant region may be engineered to more nearly resemble human constant regions to avoid immune response if the antibody is used in clinical trials and treatments in humans. It may be desirable to genetically manipulate the antibody sequence to obtain greater affinity to IL-7R and greater efficacy in inhibiting IL-7R. It will be apparent to one of skill in the art that one or more polynucleotide changes can be made to the antagonist IL-7R antibody and still maintain its binding ability to IL-7R.

There are four general steps to humanize a monoclonal antibody. These are: (1) determining the nucleotide and predicted amino acid sequence of the starting antibody light and heavy variable domains (2) designing the humanized antibody, i.e., deciding which antibody framework region to use during the humanizing process (3) the actual humanizing methodologies/techniques and (4) the transfection and expression of the humanized antibody. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; and 6,180,370.

A number of "humanized" antibody molecules comprising an antigen-binding site derived from a non-human immunoglobulin have been described, including chimeric antibodies having rodent or modified rodent V regions and their associated CDRs fused to human constant regions. See, for example, Winter et al. *Nature* 349:293-299, 1991, Lobuglio et al. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224, 1989, Shaw et al. *J Immunol.* 138:4534-4538, 1987, and Brown et al. *Cancer Res.* 47:3577-3583, 1987. Other references describe rodent CDRs grafted into a human supporting framework region (FR) prior to fusion with an appropriate human antibody constant region. See, for example, Riechmann et al. *Nature* 332:323-327, 1988, Verhoeyen et al. *Science* 239:1534-1536, 1988, and Jones et al. *Nature* 321:522-525, 1986. Another reference describes rodent CDRs supported by recombinantly engineered rodent framework regions. See, for example, European Patent Publication No. 0519596. These "humanized" molecules are designed to minimize unwanted immunological response toward rodent anti-human antibody molecules which limits the duration and effectiveness of therapeutic applications of those moieties in human recipients. For example, the antibody constant region can be engineered such that it is immunologically inert (e.g., does not trigger complement lysis). See, e.g. PCT Publication No. PCT/GB99/01441; UK Patent Application No. 9809951.8. Other methods of humanizing antibodies that may also be utilized are disclosed by Daugherty et al., *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476, 1991, and in U.S. Patent Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; 5,866,692; 6,210,671; and 6,350,861; and in PCT Publication No. WO 01/27160.

It is apparent that although the above discussion pertains to humanized antibodies, the general principles discussed are applicable to customizing antibodies for use, for example, in dogs, cats, primate, equines and bovines. It is further apparent that one or more aspects of humanizing an antibody described herein may be combined, e.g., CDR grafting, framework mutation and CDR mutation.

In yet another alternative, fully human antibodies may be obtained by using commercially available mice that have been engineered to express specific human immunoglobulin proteins. Transgenic animals that are designed to produce a more desirable (e.g., fully human antibodies) or more robust immune response may also be used for generation of humanized or human antibodies. Examples of such technology are Xenomouse™ from Abgenix, Inc. (Fremont, CA) and HuMAb-Mouse® and TC Mouse™ from Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

In an alternative, antibodies may be made recombinantly and expressed using any method known in the art. In another alternative, antibodies may be made recombinantly by phage display technology. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; and 6,265,150; and Winter et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455, 1994. Alternatively, the phage display technology (McCafferty et al., *Nature* 348:552-553, 1990) can be used to produce human antibodies and antibody fragments in vitro, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B cell. Phage display can be performed in a variety of formats; for review see, e.g., Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571, 1993. Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson et al., *Nature* 352:624-628, 1991, isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Mark et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991, or Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734, 1993. In a natural immune response, antibody genes accumulate mutations at a high rate (somatic hypermutation). Some of the changes introduced will confer higher affinity, and B cells displaying high-affinity surface immunoglobulin are preferentially replicated and differentiated during subsequent antigen challenge. This natural process can be mimicked by employing the technique known as "chain shuffling." (Marks et al., *Bio/Technol.* 10:779-783, 1992). In this method, the affinity of "primary" human antibodies obtained by phage display can be improved by sequentially replacing the heavy and light chain V region genes with repertoires of naturally occurring variants (repertoires) of V domain genes obtained from unimmunized donors. This technique allows the production of antibodies and antibody fragments with affinities in the pM-nM range. A strategy for making very large phage antibody repertoires (also

known as “the mother-of-all libraries”) has been described by Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21:2265-2266, 1993. Gene shuffling can also be used to derive human antibodies from rodent antibodies, where the human antibody has similar affinities and specificities to the starting rodent antibody. According to this method, which is also
5 referred to as “epitope imprinting”, the heavy or light chain V domain gene of rodent antibodies obtained by phage display technique is replaced with a repertoire of human V domain genes, creating rodent-human chimeras. Selection on antigen results in isolation of human variable regions capable of restoring a functional antigen-binding site, i.e., the epitope governs (imprints) the choice of partner. When the process is
10 repeated in order to replace the remaining rodent V domain, a human antibody is obtained (see PCT Publication No. WO 93/06213). Unlike traditional humanization of rodent antibodies by CDR grafting, this technique provides completely human antibodies, which have no framework or CDR residues of rodent origin.

Antibodies may be made recombinantly by first isolating the antibodies and
15 antibody producing cells from host animals, obtaining the gene sequence, and using the gene sequence to express the antibody recombinantly in host cells (e.g., CHO cells). Another method which may be employed is to express the antibody sequence in plants (e.g., tobacco) or transgenic milk. Methods for expressing antibodies recombinantly in plants or milk have been disclosed. See, for example, Peeters, et al. Vaccine 19:2756,
20 2001; Lonberg, N. and D. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65, 1995; and Pollock, et al., J Immunol Methods 231:147, 1999. Methods for making derivatives of antibodies, e.g., humanized, single chain, etc. are known in the art.

Immunoassays and flow cytometry sorting techniques such as fluorescence activated cell sorting (FACS) can also be employed to isolate antibodies that are specific
25 for IL-7R.

The antibodies can be bound to many different carriers. Carriers can be active and/or inert. Examples of well-known carriers include polypropylene, polystyrene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, glass, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses and magnetite. The nature of the carrier can be either
30 soluble or insoluble for purposes of the invention. Those skilled in the art will know of other suitable carriers for binding antibodies, or will be able to ascertain such, using routine experimentation. In some embodiments, the carrier comprises a moiety that targets the myocardium.

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the monoclonal antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once
5 isolated, the DNA may be placed into expression vectors (such as expression vectors disclosed in PCT Publication No. WO 87/04462), which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. See, e.g., PCT
10 Publication No. WO 87/04462. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant regions in place of the homologous murine sequences, Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984, or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. In that manner,
15 "chimeric" or "hybrid" antibodies are prepared that have the binding specificity of an IL-7R monoclonal antibody herein.

Antagonist IL-7R antibodies can be identified or characterized using methods known in the art, whereby reduction, amelioration, or neutralization of IL-7R biological activity is detected and/or measured. In some embodiments, an antagonist IL-7R
20 antibody is identified by incubating a candidate agent with IL-7R and monitoring binding and/or attendant reduction or neutralization of a biological activity of IL-7R. The binding assay may be performed with purified IL-7R polypeptide(s), or with cells naturally expressing, or transfected to express, IL-7R polypeptide(s). In one embodiment, the binding assay is a competitive binding assay, where the ability of a candidate antibody
25 to compete with a known IL-7R antagonist for IL-7R binding is evaluated. The assay may be performed in various formats, including the ELISA format. In other embodiments, an antagonist IL-7R antibody is identified by incubating a candidate agent with IL-7R and monitoring binding and attendant inhibition of STAT5 phosphorylation.

Following initial identification, the activity of a candidate antagonist IL-7R
30 antibody can be further confirmed and refined by bioassays, known to test the targeted biological activities. Alternatively, bioassays can be used to screen candidates directly. Some of the methods for identifying and characterizing antagonist IL-7R antibodies are described in detail in the Examples.

Antagonist IL-7R antibodies may be characterized using methods well known in the art. For example, one method is to identify the epitope to which it binds, or "epitope mapping." There are many methods known in the art for mapping and characterizing the location of epitopes on proteins, including solving the crystal structure of an antibody-antigen complex, competition assays, gene fragment expression assays, and synthetic peptide-based assays, as described, for example, in Chapter 11 of Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. In an additional example, epitope mapping can be used to determine the sequence to which an antagonist IL-7R antibody binds. Epitope mapping is commercially available from various sources, for example, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, The Netherlands). The epitope can be a linear epitope, i.e., contained in a single stretch of amino acids, or a conformational epitope formed by a three-dimensional interaction of amino acids that may not necessarily be contained in a single stretch. Peptides of varying lengths (e.g., at least 4-6 amino acids long) can be isolated or synthesized (e.g., recombinantly) and used for binding assays with an antagonist IL-7R antibody. In another example, the epitope to which the antagonist IL-7R antibody binds can be determined in a systematic screening by using overlapping peptides derived from the IL-7R sequence and determining binding by the antagonist IL-7R antibody. According to the gene fragment expression assays, the open reading frame encoding IL-7R is fragmented either randomly or by specific genetic constructions and the reactivity of the expressed fragments of IL-7R with the antibody to be tested is determined. The gene fragments may, for example, be produced by PCR and then transcribed and translated into protein in vitro, in the presence of radioactive amino acids. The binding of the antibody to the radioactively labeled IL-7R fragments is then determined by immunoprecipitation and gel electrophoresis. Certain epitopes can also be identified by using large libraries of random peptide sequences displayed on the surface of phage particles (phage libraries). Alternatively, a defined library of overlapping peptide fragments can be tested for binding to the test antibody in simple binding assays. In an additional example, mutagenesis of an antigen binding domain, domain swapping experiments and alanine scanning mutagenesis can be performed to identify residues required, sufficient, and/or necessary for epitope binding. For example, domain swapping experiments can be performed using a mutant IL-7R in which various fragments of the IL-7R polypeptide

have been replaced (swapped) with sequences from IL-7R from another species, or a closely related, but antigenically distinct protein (such as another member of the proprotein convertase family). By assessing binding of the antibody to the mutant IL-7R, the importance of the particular IL-7R fragment to antibody binding can be assessed.

5 Yet another method which can be used to characterize an antagonist IL-7R antibody is to use competition assays with other antibodies known to bind to the same antigen, i.e., various fragments on IL-7R, to determine if the antagonist IL-7R antibody binds to the same epitope as other antibodies. Competition assays are well known to those of skill in the art.

10 An expression vector can be used to direct expression of an antagonist IL-7R antibody. One skilled in the art is familiar with administration of expression vectors to obtain expression of an exogenous protein in vivo. See, e.g., U.S. Patent Nos. 6,436,908; 6,413,942; and 6,376,471. Administration of expression vectors includes local or systemic administration, including injection, oral administration, particle gun or
15 catheterized administration, and topical administration. In another embodiment, the expression vector is administered directly to the sympathetic trunk or ganglion, or into a coronary artery, atrium, ventricle, or pericardium.

Targeted delivery of therapeutic compositions containing an expression vector, or subgenomic polynucleotides can also be used. Receptor-mediated DNA delivery
20 techniques are described in, for example, Findeis et al., Trends Biotechnol., 1993, 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer, J.A. Wolff, ed., 1994; Wu et al., J. Biol. Chem., 1988, 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem., 1994, 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem., 1991, 266:338. Therapeutic compositions containing a
25 polynucleotide are administered in a range of about 100 ng to about 200 mg of DNA for local administration in a gene therapy protocol. Concentration ranges of about 500 ng to about 50 mg, about 1 μ g to about 2 mg, about 5 μ g to about 500 μ g, and about 20 μ g to about 100 μ g of DNA can also be used during a gene therapy protocol. The therapeutic polynucleotides and polypeptides can be delivered using gene delivery
30 vehicles. The gene delivery vehicle can be of viral or non-viral origin (see generally, Jolly, Cancer Gene Therapy, 1994, 1:51; Kimura, Human Gene Therapy, 1994, 5:845; Connelly, Human Gene Therapy, 1995, 1:185; and Kaplitt, Nature Genetics, 1994, 6:148). Expression of such coding sequences can be induced using endogenous

mammalian or heterologous promoters. Expression of the coding sequence can be either constitutive or regulated.

Viral-based vectors for delivery of a desired polynucleotide and expression in a desired cell are well known in the art. Exemplary viral-based vehicles include, but are not limited to, recombinant retroviruses (see, e.g., PCT Publication Nos. WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; U.S. Patent Nos. 5, 219,740 and 4,777,127; GB Patent No. 2,200,651; and EP Patent No. 0 345 242), alphavirus-based vectors (e.g., Sindbis virus vectors, Semliki forest virus (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Ross River virus (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) and Venezuelan equine encephalitis virus (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), and adeno-associated virus (AAV) vectors (see, e.g., PCT Publication Nos. WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 and WO 95/00655). Administration of DNA linked to killed adenovirus as described in Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147 can also be employed.

Non-viral delivery vehicles and methods can also be employed, including, but not limited to, polycationic condensed DNA linked or unlinked to killed adenovirus alone (see, e.g., Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147); ligand-linked DNA (see, e.g., Wu, J. Biol. Chem., 1989, 264:16985); eukaryotic cell delivery vehicles cells (see, e.g., U.S. Patent No. 5,814,482; PCT Publication Nos. WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; and WO 97/42338) and nucleic charge neutralization or fusion with cell membranes. Naked DNA can also be employed. Exemplary naked DNA introduction methods are described in PCT Publication No. WO 90/11092 and U.S. Patent No. 5,580,859. Liposomes that can act as gene delivery vehicles are described in U.S. Patent No. 5,422,120; PCT Publication Nos. WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; and EP 0524968. Additional approaches are described in Philip, Mol. Cell Biol., 1994, 14:2411, and in Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91:1581.

In some embodiments, the invention encompasses compositions, including pharmaceutical compositions, comprising antibodies described herein or made by the methods and having the characteristics described herein. As used herein, compositions comprise one or more antibodies that antagonize the interaction of IL-7R with IL-7, and/or one or more polynucleotides comprising sequences encoding one or more these antibodies. These compositions may further comprise suitable excipients, such as

pharmaceutically acceptable excipients including buffers, which are well known in the art.

The antagonist IL-7R antibodies of the invention are characterized by any (one or more) of the following characteristics: (a) bind to IL-7R; (b) block IL-7R interaction with IL-7; (c) block or decrease IL-7-mediated STAT5 phosphorylation; (d) decrease blood glucose levels *in vivo*; (e) improve glucose tolerance *in vivo*; and (f) reduce disease severity in EAE. Preferably, antagonist IL-7R antibodies have two or more of these features. More preferably, the antibodies have three or more of the features. More preferably, the antibodies have four or more of the features. More preferably, the antibodies have five or more of the features. Most preferably, the antibodies have all six characteristics.

Accordingly, the invention provides any of the following, or compositions (including pharmaceutical compositions) comprising any of the following: (a) an antibody having a partial light chain sequence of

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSG
VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCQSYDSSHLVFGGGTKLTVLC (SEQ ID
NO: 1),
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGRIASSYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSG
VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYASSSLWVFGGGTQLTVLS (SEQ
ID NO: 3),
NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSG
VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCMQYDSSHLVFGGGTKLTVLC (SEQ ID
NO: 5),
NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSG
VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVLC (SEQ ID
NO: 7),
NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSG
VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVLC (SEQ ID
NO: 9),
NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYEDDQRPSG
VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCMQYDFHHLVFGGGTKLTVLC (SEQ ID
NO: 11),

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSG
VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCMQYDFHHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO: 44), or

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDDQRPSG
5 VPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO: 41); and (b) an antibody having a partial heavy chain sequence of
QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWLSLVGWDG
SATYYADSVKGRFTISRDN TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYVFDYWGGGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 2),

10 QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVSAISGGG
STYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRDEDTAVYYCARDISGGGMDVWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO: 4),

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWLSLVGWDG
FFTYYADSVKGRFTISRDN TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYVFNNWGQGTL
15 VTVSS (SEQ ID NO: 6),

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWLSLVGWDG
FFTYYADSVKGRFTISRDN TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 8),

20 QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWLSLVGWDG
FFTYYADSVKGRFTISRDN TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 10),

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWLSLVGWDG
FFTYYADSVKGRFTISRDN TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 12), or

25 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWVSLVGWDG
FFTYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYMGNNWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO: 40).

.

Table 1

mAb	Light Chain	Heavy Chain
P3A9	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTIS <u>C</u> <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQR GNSPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDR	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFDD</u> SVMHWRQAPGKGLEWLS <u>LVGWDG</u> <u>SATYYADSVKGRFTISRDN</u>

mAb	Light Chain	Heavy Chain
	FSGSIDSSSNSASLTISGLVTE DEADYYC <u>QSYDSSHLV</u> FGGG TKLTVLC (SEQ ID NO: 1)	TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>Q</u> <u>GDYVFDY</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 2)
P4B3	NFMLTQPHSVSESPGKTVTIS C <u>TRSSGRIASSYVQ</u> WYQQR GSAPTTVIY <u>EDNQRPS</u> GVPDR FSGSIDSSSNSASLTISGLKTE DEADYYC <u>QSYASSSLWV</u> FGG GTQLTVLS (SEQ ID NO: 3)	QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVS</u> <u>AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN</u> KNTVYLQMNSLRDEDTAVYYCARD <u>DIS</u> <u>GGGMDV</u> WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 4)
P2D2	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTIS C <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQR GNSPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDR FSGSIDSSSNSASLTISGLVTE DEADYYC <u>MQYDSSHLV</u> FGGG TKLTVLC (SEQ ID NO: 5)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWLS</u> <u>LVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDN</u> TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>Q</u> <u>GDYVFNN</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 6)
P2E11	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTIS C <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQR GNSPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDR FSGSIDSSSNSASLTISGLVTE DEADYYC <u>QSYDFHHLV</u> FGGG TKLTVLC (SEQ ID NO: 7)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWLS</u> <u>LVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDN</u> TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>Q</u> <u>GDYMGDY</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 8)
HAL 403a	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTIS C <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQR GNSPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDR FSGSIDSSSNSASLTISGLVTE DEADYYC <u>QSYDFHHLV</u> FGGG TKLTVLC (SEQ ID NO: 9)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWLS</u> <u>LVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDN</u> TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>Q</u> <u>GDYMGNN</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 10)
HAL 403b	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTIS C <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQR GNSPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDR FSGSIDSSSNSASLTISGLVTE DEADYYC <u>MQYDFHHLV</u> FGGG	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEWLS</u> <u>LVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDN</u> TKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>Q</u> <u>GDYMGNN</u> WGQGTLVTVSS (SEQ ID

mAb	Light Chain	Heavy Chain
	TKLTVLC (SEQ ID NO: 11)	NO: 12)
C1GM	NFMLTQPHSVSESPGKTVTIS <u>CTRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQRP GSSPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDR FSGSIDSSSNSASLTISGLKTE DEADYYC <u>QSYDFHHLV</u> FGGG TKLTVL (SEQ ID NO: 41)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFDDSV</u> MHWVRQAPGKGLEWVS <u>LVGWDGFF</u> TYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>Q</u> <u>GDYMGNN</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 40)
C2M3	NFMLTQPHSVSESPGKTVTIS <u>CTRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQRP GSSPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDR FSGSIDSSSNSASLTISGLKTE DEADYYC <u>MQYDFHHLV</u> FGGG TKLTVL (SEQ ID NO: 44)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>GFTFDDSV</u> MHWVRQAPGKGLEWVS <u>LVGWDGFF</u> TYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>Q</u> <u>GDYMGNN</u> WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 40)

In Table 1, the underlined sequences are CDR sequences according to Kabat and in bold according to Chothia.

The invention also provides CDR portions of antibodies to IL-7R (including
5 Chothia, Kabat CDRs, and CDR contact regions). Determination of CDR regions is well within the skill of the art. It is understood that in some embodiments, CDRs can be a combination of the Kabat and Chothia CDR (also termed "combined CRs" or "extended CDRs"). In some embodiments, the CDRs are the Kabat CDRs. In other embodiments, the CDRs are the Chothia CDRs. In other words, in embodiments with more than one
10 CDR, the CDRs may be any of Kabat, Chothia, combination CDRs, or combinations thereof. Table 2 provides examples of CDR sequences provided herein.

Table 2

Heavy Chain			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
P3A9	DSVMH (SEQ ID NO: 19)	LVGWDGSATYYADSVKG (SEQ ID NO: 21)	QGDYVFDY (SEQ ID NO: 24)
P4B3	NYGMH (SEQ ID NO: 20)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO: 22)	DISGGGMDV (SEQ ID NO: 25)
P2D2	DSVMH (SEQ ID NO: 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEQ ID NO: 21)	QGDYVFNN (SEQ ID NO: 24)

	NO: 19)	(SEQ ID NO: 23)	ID NO: 26)
P2E11	DSVMH (SEQ ID NO: 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEQ ID NO: 23)	QGDYMGDY (SEQ ID NO: 27)
HAL 403a	DSVMH (SEQ ID NO: 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEQ ID NO: 23)	QGDYMGNN (SEQ ID NO: 28)
C1GM	DSVMH (SEQ ID NO: 19) (Kabat); GFTFDDS (SEQ ID NO: 46) (Chothia); GFTFDDSVMH (SEQ ID NO: 47) (extended)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEQ ID NO: 23) (Kabat); GWDGFF (SEQ ID NO: 48) (Chothia);	QGDYMGNN (SEQ ID NO: 49);
C2M3	DSVMH (SEQ ID NO: 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEQ ID NO: 23)	QGDYMGNN (SEQ ID NO: 49)
HAL 403b	DSVMH (SEQ ID NO: 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEQ ID NO: 23)	QGDYMGNN (SEQ ID NO: 28)
Heavy Chain consensus	X ₁ X ₂ VMH, wherein X ₁ is D or N; X ₂ is S or Y (SEQ ID NO: 50)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GX ₆ X ₇ TYADSVKG, wherein X ₁ is L or A; X ₂ is V or I; X ₃ is G or S; X ₄ is W or G; X ₅ is D or S; X ₆ is F, G or S; X ₇ is F, A or S (SEQ ID NO: 51)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ , wherein X ₁ is Q or D; X ₂ is G or I; X ₃ is D or S; X ₄ is Y or G; X ₅ is M, V or G; X ₆ is G or F; X ₇ is N, D or M; X ₈ is N, Y or D (SEQ ID NO: 52)
Light Chain			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
P3A9	TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29)	EDDQRPS (SEQ ID NO: 31)	QSYDSSHLV (SEQ ID NO: 33)
P4B3	TGSSGRIASSYVQ (SEQ ID NO: 30)	EDNQRPS (SEQ ID NO: 32)	QSYASSSLWV (SEQ ID NO: 34)
P2D2	TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29)	EDDQRPS (SEQ ID NO: 31)	MQYDSSHLV (SEQ ID NO: 35)

P2E11	TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29)	EDDQRPS (SEQ ID NO: 31)	QSYDFHHLV (SEQ ID NO: 36)
HAL 403a	TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29)	EDDQRPS (SEQ ID NO: 31)	QSYDFHHLV (SEQ ID NO: 36)
C1GM	TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29)	EDDQRPS (SEQ ID NO: 31)	QSYDFHHLV (SEQ ID NO: 36)
C2M3	TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29)	EDDQRPS (SEQ ID NO: 31)	MQYDFHHLV (SEQ ID NO: 37)
HAL 403b	TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29)	EDDQRPS (SEQ ID NO: 31)	MQYDFHHLV (SEQ ID NO: 37)
Light Chain consen sus	TX ₁ SSGX ₂ IX ₃ SSYVQ wherein X ₁ is R or G; X ₂ is S or R ; X ₃ is D or A (SEQ ID NO: 53)	EDX ₁ QRPS wherein X ₁ is D or N (SEQ ID NO: 54)	X ₁ X ₂ YX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ LX ₇ wherein X ₁ is Q or M; X ₂ is S or Q; X ₃ is D or A; X ₄ is F or S; X ₅ is H or S; X ₆ is H or S; X ₇ is V or W (SEQ ID NO: 55)

CDR contact regions are regions of an antibody that imbue specificity to the antibody for an antigen. In general, CDR contact regions include the residue positions in the CDRs and Vernier zones which are constrained in order to maintain proper loop structure for the antibody to bind a specific antigen. See, e.g., Makabe et al., 2007, "Thermodynamic Consequences of Mutations in Vernier Zone Residues of a Humanized Anti-human Epidermal Growth Factor Receptor Murine Antibody," Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. Determination of CDR contact regions is well within the skill of the art. In some embodiments, an antagonist IL-7R antibody comprises one or more CDR contact regions comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of FTFDDSV (SEQ ID NO: 56), GWDGFF (SEQ ID NO: 57), ARX₁X₂X₃X₄ wherein X₁, X₂, X₃, and X₄ can be any amino acid, (SEQ ID NO: 58), SGSIDSSY (SEQ ID NO: 59), EDDQRPSGV (SEQ ID NO: 60), and FHHL (SEQ ID NO: 61).

The binding affinity (K_D) of an antagonist IL-7R antibody to IL-7R can be about 0.002 to about 200 nM. In some embodiments, the binding affinity is any of about 200 nM, 100 nM, about 50 nM, about 10 nM, about 1 nM, about 500 pM, about 100 pM,

about 60 pM, about 50 pM, about 20 pM, about 15 pM, about 10 pM, about 5 pM, or about 2 pM. In some embodiments, the binding affinity is less than any of about 250 nM, about 200 nM, about 100 nM, about 50 nM, about 10 nM, about 1 nM, about 500 pM, about 100 pM, or about 50 pM.

5 The invention also provides methods of making any of these antibodies. The antibodies of this invention can be made by procedures known in the art. The polypeptides can be produced by proteolytic or other degradation of the antibodies, by recombinant methods (i.e., single or fusion polypeptides) as described above or by chemical synthesis. Polypeptides of the antibodies, especially shorter polypeptides up to about 50 amino acids, are conveniently made by chemical synthesis. Methods of chemical synthesis are known in the art and are commercially available. For example, an antibody could be produced by an automated polypeptide synthesizer employing the solid phase method. See also, U.S. Patent Nos. 5,807,715; 4,816,567; and 6,331,415.

15 In another alternative, the antibodies can be made recombinantly using procedures that are well known in the art. In one embodiment, a polynucleotide comprises a sequence encoding the heavy chain and/or the light chain variable regions of antibody P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a, HAL403b, C1GM, or C2M3. The sequence encoding the antibody of interest may be maintained in a vector in a host cell and the host cell can then be expanded and frozen for future use. Vectors (including expression vectors) and host cells are further described herein.

25 The invention also encompasses scFv of antibodies of this invention. Single chain variable region fragments are made by linking light and/or heavy chain variable regions by using a short linking peptide (Bird et al., 1988, Science 242:423-426). An example of a linking peptide is (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 13), which bridges approximately 3.5 nm between the carboxy terminus of one variable region and the amino terminus of the other variable region. Linkers of other sequences have been designed and used (Bird et al., 1988, supra). Linkers should be short, flexible polypeptides and preferably comprised of less than about 20 amino acid residues. Linkers can in turn be modified for additional functions, such as attachment of drugs or attachment to solid supports. The single chain variants can be produced either recombinantly or synthetically. For synthetic production of scFv, an automated synthesizer can be used. For recombinant production of scFv, a suitable plasmid containing polynucleotide that encodes the scFv can be introduced into a suitable host

cell, either eukaryotic, such as yeast, plant, insect or mammalian cells, or prokaryotic, such as *E. coli*. Polynucleotides encoding the scFv of interest can be made by routine manipulations such as ligation of polynucleotides. The resultant scFv can be isolated using standard protein purification techniques known in the art.

5 Other forms of single chain antibodies, such as diabodies are also encompassed. Diabodies are bivalent, bispecific antibodies in which heavy chain variable (VH) and light chain variable (VL) domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain, thereby forcing the domains to pair with complementary domains of another chain and
10 creating two antigen binding sites (see e.g., Holliger, P., et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al., 1994, *Structure* 2:1121-1123).

For example, bispecific antibodies, monoclonal antibodies that have binding specificities for at least two different antigens, can be prepared using the antibodies disclosed herein. Methods for making bispecific antibodies are known in the art (see,
15 e.g., Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology* 121:210). Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies was based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, with the two heavy chains having different specificities (Millstein and Cuello, 1983, *Nature* 305, 537-539).

According to one approach to making bispecific antibodies, antibody variable
20 domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant region sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant region, comprising at least part of the hinge, CH2 and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy chain constant region (CH1), containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the
25 fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are cotransfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the
30 optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In one approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. This asymmetric structure, with an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule, facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations. This approach is described in PCT Publication No. WO 94/04690.

Heteroconjugate antibodies, comprising two covalently joined antibodies, are also within the scope of the invention. Such antibodies have been used to target immune system cells to unwanted cells (U.S. Patent No. 4,676,980), and for treatment of HIV infection (PCT Publication Nos. WO 91/00360 and WO 92/200373; EP 03089). Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents and techniques are well known in the art, and are described in U.S. Patent No. 4,676,980.

Chimeric or hybrid antibodies also may be prepared in vitro using known methods of synthetic protein chemistry, including those involving cross-linking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

Humanized antibodies can be made using any methods known in the art. For example, four general steps may be used to humanize a monoclonal antibody. These are: (1) determining the nucleotide and predicted amino acid sequence of the starting antibody light and heavy variable domains (2) designing the humanized antibody, i.e., deciding which antibody framework region to use during the humanizing process (3) the actual humanizing methodologies/techniques and (4) the transfection and expression of the humanized antibody. See, for example, U.S. Patent Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; 6,331,415; 5,530,101; 5,693,761; 5,693,762; 5,585,089; and 6,180,370.

In the recombinant humanized antibodies, the Fc γ portion can be modified to avoid interaction with Fc γ receptor and the complement and immune systems. The techniques for preparation of such antibodies are described in WO 99/58572. For example, the constant region may be engineered to more resemble human constant regions to avoid immune response if the antibody is used in clinical trials and treatments in humans. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,997,867 and 5,866,692.

The invention encompasses modifications to the antibodies and polypeptides of the invention variants shown in Table 1, including functionally equivalent antibodies which do not significantly affect their properties and variants which have enhanced or decreased activity and/or affinity. For example, the amino acid sequence may be mutated to obtain an antibody with the desired binding affinity to IL-7R. Modification of polypeptides is routine practice in the art and need not be described in detail herein. Examples of modified polypeptides include polypeptides with conservative substitutions of amino acid residues, one or more deletions or additions of amino acids which do not significantly deleteriously change the functional activity, or which mature (enhance) the affinity of the polypeptide for its ligand, or use of chemical analogs.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to an epitope tag. Other insertional variants of the antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the antibody of an enzyme or a polypeptide which increases the half-life of the antibody in the blood circulation.

Substitution variants have at least one amino acid residue in the antibody molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 3 under the heading of "conservative substitutions." If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 3, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

Table 3: Amino Acid Substitutions

Original Residue	Conservative Substitutions	Exemplary Substitutions
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn

Original Residue	Conservative Substitutions	Exemplary Substitutions
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine
Leu (L)	Ile	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) Non-polar: Norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Polar without charge: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Acidic (negatively charged): Asp, Glu;
- (4) Basic (positively charged): Lys, Arg;
- (5) Residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- (6) Aromatic: Trp, Tyr, Phe, His.

Non-conservative substitutions are made by exchanging a member of one of these classes for another class.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant cross-linking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability, particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment.

Amino acid modifications can range from changing or modifying one or more amino acids to complete redesign of a region, such as the variable region. Changes in the variable region can alter binding affinity and/or specificity. In some embodiments, no more than one to five conservative amino acid substitutions are made within a CDR domain. In other embodiments, no more than one to three conservative amino acid substitutions are made within a CDR domain. In still other embodiments, the CDR domain is CDR H3 and/or CDR L3.

Modifications also include glycosylated and nonglycosylated polypeptides, as well as polypeptides with other post-translational modifications, such as, for example, glycosylation with different sugars, acetylation, and phosphorylation. Antibodies are glycosylated at conserved positions in their constant regions (Jefferis and Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright and Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32). The oligosaccharide side chains of the immunoglobulins affect the protein's function (Boyd et al., 1996, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe and Howard, 1990, *Biochem.* 29:4175-4180) and the intramolecular interaction between portions of the glycoprotein, which can affect the conformation and presented three-dimensional surface of the glycoprotein (Jefferis and Lund, *supra*; Wyss and Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Oligosaccharides may also serve to target a given glycoprotein to certain molecules based upon specific recognition structures. Glycosylation of antibodies has also been reported to affect antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In particular, CHO cells with tetracycline-regulated expression of $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII), a glycosyltransferase catalyzing formation of bisecting GlcNAc, was reported to have improved ADCC activity (Umana et al., 1999, *Mature Biotech.* 17:176-180).

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine, asparagine-X-threonine, and asparagine-X-cysteine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side

chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-acetylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites).

The glycosylation pattern of antibodies may also be altered without altering the underlying nucleotide sequence. Glycosylation largely depends on the host cell used to express the antibody. Since the cell type used for expression of recombinant glycoproteins, e.g. antibodies, as potential therapeutics is rarely the native cell, variations in the glycosylation pattern of the antibodies can be expected (see, e.g. Hse et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:9062-9070).

In addition to the choice of host cells, factors that affect glycosylation during recombinant production of antibodies include growth mode, media formulation, culture density, oxygenation, pH, purification schemes and the like. Various methods have been proposed to alter the glycosylation pattern achieved in a particular host organism including introducing or overexpressing certain enzymes involved in oligosaccharide production (U.S. Patent Nos. 5,047,335; 5,510,261 and 5,278,299). Glycosylation, or certain types of glycosylation, can be enzymatically removed from the glycoprotein, for example, using endoglycosidase H (Endo H), N-glycosidase F, endoglycosidase F1, endoglycosidase F2, endoglycosidase F3. In addition, the recombinant host cell can be genetically engineered to be defective in processing certain types of polysaccharides. These and similar techniques are well known in the art.

Other methods of modification include using coupling techniques known in the art, including, but not limited to, enzymatic means, oxidative substitution and chelation. Modifications can be used, for example, for attachment of labels for immunoassay. Modified polypeptides are made using established procedures in the art and can be screened using standard assays known in the art, some of which are described below and in the Examples.

In some embodiments of the invention, the antibody comprises a modified constant region, such as a constant region that has increased affinity to a human Fc gamma receptor, is immunologically inert or partially inert, e.g., does not trigger complement mediated lysis, does not stimulate antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), or does not activate microglia; or has reduced activities (compared to the unmodified antibody) in any one or more of the following: triggering complement mediated lysis, stimulating antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), or activating microglia. Different modifications of the constant region may be used to achieve optimal level and/or combination of effector functions. See, for example, Morgan et al., *Immunology* 86:319-324, 1995; Lund et al., *J. Immunology* 157:4963-9 157:4963-4969, 1996; Idusogie et al., *J. Immunology* 164:4178-4184, 2000; Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; and Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76, 1998. In some embodiments, the constant region is modified as described in Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624; PCT Application No. PCT/GB99/01441; and/or UK Patent Application No. 9809951.8. In other embodiments, the antibody comprises a human heavy chain IgG2 constant region comprising the following mutations: A330P331 to S330S331 (amino acid numbering with reference to the wild type IgG2 sequence). Eur. J. Immunol., 1999, 29:2613-2624. In still other embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation. In some embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation by mutating the glycosylated amino acid residue or flanking residues that are part of the N-glycosylation recognition sequence in the constant region. For example, N-glycosylation site N297 may be mutated to A, Q, K, or H. See, Tao et al., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; and Jefferis et al., *Immunological Reviews* 163:59-76, 1998. In some embodiments, the constant region is aglycosylated for N-linked glycosylation. The constant region may be aglycosylated for N-linked glycosylation enzymatically (such as removing carbohydrate by enzyme PNGase), or by expression in a glycosylation deficient host cell.

Other antibody modifications include antibodies that have been modified as described in PCT Publication No. WO 99/58572. These antibodies comprise, in addition to a binding domain directed at the target molecule, an effector domain having an amino acid sequence substantially homologous to all or part of a constant region of a human immunoglobulin heavy chain. These antibodies are capable of binding the target molecule without triggering significant complement dependent lysis, or cell-mediated

destruction of the target. In some embodiments, the effector domain is capable of specifically binding FcRn and/or FcγRIIb. These are typically based on chimeric domains derived from two or more human immunoglobulin heavy chain C_H2 domains. Antibodies modified in this manner are particularly suitable for use in chronic antibody
5 therapy, to avoid inflammatory and other adverse reactions to conventional antibody therapy.

The invention includes affinity matured embodiments. For example, affinity matured antibodies can be produced by procedures known in the art (Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10:779-783; Barbas et al., 1994, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-
10 3813; Schier et al., 1995, Gene, 169:147-155; Yelton et al., 1995, J. Immunol., 155:1994-2004; Jackson et al., 1995, J. Immunol., 154(7):3310-9; Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896; and PCT Publication No. WO2004/058184).

The following methods may be used for adjusting the affinity of an antibody and for characterizing a CDR. One way of characterizing a CDR of an antibody and/or
15 altering (such as improving) the binding affinity of a polypeptide, such as an antibody, termed "library scanning mutagenesis". Generally, library scanning mutagenesis works as follows. One or more amino acid positions in the CDR are replaced with two or more (such as 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20) amino acids using art recognized methods. This generates small libraries of clones (in some
20 embodiments, one for every amino acid position that is analyzed), each with a complexity of two or more members (if two or more amino acids are substituted at every position). Generally, the library also includes a clone comprising the native (unsubstituted) amino acid. A small number of clones, e.g., about 20-80 clones (depending on the complexity of the library), from each library are screened for binding
25 affinity to the target polypeptide (or other binding target), and candidates with increased, the same, decreased, or no binding are identified. Methods for determining binding affinity are well-known in the art. Binding affinity may be determined using Biacore™ surface plasmon resonance analysis, which detects differences in binding affinity of about 2-fold or greater. Biacore™ is particularly useful when the starting antibody
30 already binds with a relatively high affinity, for example a K_D of about 10 nM or lower. Screening using Biacore™ surface plasmon resonance is described in the Examples, herein.

Binding affinity may be determined using Kinexa Biocensor, scintillation proximity assays, ELISA, ORIGEN immunoassay (IGEN), fluorescence quenching, fluorescence transfer, and/or yeast display. Binding affinity may also be screened using a suitable bioassay.

5 In some embodiments, every amino acid position in a CDR is replaced (in some embodiments, one at a time) with all 20 natural amino acids using art recognized mutagenesis methods (some of which are described herein). This generates small libraries of clones (in some embodiments, one for every amino acid position that is analyzed), each with a complexity of 20 members (if all 20 amino acids are substituted
10 at every position).

In some embodiments, the library to be screened comprises substitutions in two or more positions, which may be in the same CDR or in two or more CDRs. Thus, the library may comprise substitutions in two or more positions in one CDR. The library may comprise substitution in two or more positions in two or more CDRs. The library may
15 comprise substitution in 3, 4, 5, or more positions, said positions found in two, three, four, five or six CDRs. The substitution may be prepared using low redundancy codons. See, e.g., Table 2 of Balint et al., 1993, Gene 137(1):109-18.

The CDR may be CDRH3 and/or CDRL3. The CDR may be one or more of CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2, and/or CDRH3. The CDR may be a Kabat
20 CDR, a Chothia CDR, or an extended CDR.

Candidates with improved binding may be sequenced, thereby identifying a CDR substitution mutant which results in improved affinity (also termed an "improved" substitution). Candidates that bind may also be sequenced, thereby identifying a CDR substitution which retains binding.

25 Multiple rounds of screening may be conducted. For example, candidates (each comprising an amino acid substitution at one or more position of one or more CDR) with improved binding are also useful for the design of a second library containing at least the original and substituted amino acid at each improved CDR position (i.e., amino acid position in the CDR at which a substitution mutant showed improved binding).
30 Preparation, and screening or selection of this library is discussed further below.

Library scanning mutagenesis also provides a means for characterizing a CDR, in so far as the frequency of clones with improved binding, the same binding, decreased binding or no binding also provide information relating to the importance of each amino

acid position for the stability of the antibody-antigen complex. For example, if a position of the CDR retains binding when changed to all 20 amino acids, that position is identified as a position that is unlikely to be required for antigen binding. Conversely, if a position of CDR retains binding in only a small percentage of substitutions, that position is identified as a position that is important to CDR function. Thus, the library scanning mutagenesis methods generate information regarding positions in the CDRs that can be changed to many different amino acids (including all 20 amino acids), and positions in the CDRs which cannot be changed or which can only be changed to a few amino acids.

Candidates with improved affinity may be combined in a second library, which includes the improved amino acid, the original amino acid at that position, and may further include additional substitutions at that position, depending on the complexity of the library that is desired, or permitted using the desired screening or selection method. In addition, if desired, adjacent amino acid position can be randomized to at least two or more amino acids. Randomization of adjacent amino acids may permit additional conformational flexibility in the mutant CDR, which may in turn, permit or facilitate the introduction of a larger number of improving mutations. The library may also comprise substitution at positions that did not show improved affinity in the first round of screening.

The second library is screened or selected for library members with improved and/or altered binding affinity using any method known in the art, including screening using Biacore™ surface plasmon resonance analysis, and selection using any method known in the art for selection, including phage display, yeast display, and ribosome display.

The invention also encompasses fusion proteins comprising one or more fragments or regions from the antibodies of this invention. In one embodiment, a fusion polypeptide is provided that comprises at least 10 contiguous amino acids of the variable light chain region shown in SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 41 or 44 and/or at least 10 amino acids of the variable heavy chain region shown in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12 or 40. In other embodiments, a fusion polypeptide is provided that comprises at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous amino acids of the variable light chain region and/or at least about 10, at least about 15, at least about 20, at least about 25, or at least about 30 contiguous

amino acids of the variable heavy chain region. In another embodiment, the fusion polypeptide comprises a light chain variable region and/or a heavy chain variable region, as shown in any of the sequence pairs selected from among SEQ ID NOs: 1 and 2, 3 and 4, 5 and 6, 7 and 8, 9 and 10, 11 and 12, 41 and 40, and 44 and 40. In another
5 embodiment, the fusion polypeptide comprises one or more CDR(s). In still other embodiments, the fusion polypeptide comprises CDR H3 (VH CDR3) and/or CDR L3 (VL CDR3). For purposes of this invention, a fusion protein contains one or more antibodies and another amino acid sequence to which it is not attached in the native molecule, for example, a heterologous sequence or a homologous sequence from
10 another region. Exemplary heterologous sequences include, but are not limited to a "tag" such as a FLAG tag or a 6His tag. Tags are well known in the art.

A fusion polypeptide can be created by methods known in the art, for example, synthetically or recombinantly. Typically, the fusion proteins of this invention are made by preparing an expressing a polynucleotide encoding them using recombinant methods
15 described herein, although they may also be prepared by other means known in the art, including, for example, chemical synthesis.

This invention also provides compositions comprising antibodies conjugated (for example, linked) to an agent that facilitate coupling to a solid support (such as biotin or avidin). For simplicity, reference will be made generally to antibodies with the
20 understanding that these methods apply to any of the IL-7R binding and/or antagonist embodiments described herein. Conjugation generally refers to linking these components as described herein. The linking (which is generally fixing these components in proximate association at least for administration) can be achieved in any number of ways. For example, a direct reaction between an agent and an antibody is
25 possible when each possesses a substituent capable of reacting with the other. For example, a nucleophilic group, such as an amino or sulfhydryl group, on one may be capable of reacting with a carbonyl-containing group, such as an anhydride or an acid halide, or with an alkyl group containing a good leaving group (e.g., a halide) on the other.

30 An antibody or polypeptide of this invention may be linked to a labeling agent such as a fluorescent molecule, a radioactive molecule or any others labels known in the art. Labels are known in the art which generally provide (either directly or indirectly) a signal.

The invention also provides compositions (including pharmaceutical compositions) and kits comprising, as this disclosure makes clear, any or all of the antibodies and/or polypeptides described herein.

The invention also provides isolated polynucleotides encoding the antibodies of
5 the invention, and vectors and host cells comprising the polynucleotide.

Accordingly, the invention provides polynucleotides (or compositions, including pharmaceutical compositions), comprising polynucleotides encoding any of the following: the antibodies C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a and HAL403b, or any fragment or part thereof having the ability to antagonize IL-7R.

10 In another aspect, the invention provides polynucleotides encoding any of the antibodies (including antibody fragments) and polypeptides described herein, such as antibodies and polypeptides having impaired effector function. Polynucleotides can be made and expressed by procedures known in the art.

In another aspect, the invention provides compositions (such as a pharmaceutical
15 compositions) comprising any of the polynucleotides of the invention. In some embodiments, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding the antibody as described herein. In other embodiment, the composition comprises an expression vector comprising a polynucleotide encoding any of the antibodies described herein. In still other embodiments, the composition
20 comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO: 38 and SEQ ID NO: 39 below:

C1GM heavy chain variable region

GAGGTCCAGTTAGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCGGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTCTGTGCATGCACTGGGT
25 CCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTTTCTCTTGTTGGTTGGGATGGT
TTTTTTACATACTATGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAC
GCGAAGAACTCTCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTG
TGTATTACTGTGCGAGACAAGGGGATTACATGGGGAACAACCTGGGGCCAGGGAAC
CCTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 38)

30 *C2GM light chain variable region*

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGGAATCTCCGGGAAAGACGGTGAC
CATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGACAGTTCCTATGTGCAGTGGTAC
CAGCAGCGCCCGGGCAGCTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATGACCAAAGAC

CCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACTCTGCC
TCCCTCACCATCTCTGGACTGAAAAGTGAAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGTC
TTATGATTTTCATCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEQ
ID NO: 39).

- 5 In still other embodiments, the composition comprises either or both of the polynucleotides shown in SEQ ID NO: 14 and SEQ ID NO: 15 below:

HAL403a heavy chain variable region

CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCGGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTCTGTCATGCACTGGGT
10 CCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTCTCTCTTGTGTTGGTGGGATGGT
TTTTTTACATACTATGCAGACTCAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC
ACCAAGAACTTACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCGAGACAAGGGGATTACATGGGGAACAACTGGGGCCAGGGAACC
CTGGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 14)

- 15 *HAL403a light chain variable region*

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGGGTCTCCGGGAAAGACGGTGA
CCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGACAGTTCCTATGTGCAGTGGTA
CCAGCAGCGCCCGGGCAATTCCCCCACCCTGTGATCTATGAGGATGACCAAAGA
CCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACTCTGC
20 CTCCCTCACCATCTCTGGACTGGTGAAGTGAAGGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGT
CTTATGATTTTCATCATCTGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTATGT
(SEQ ID NO: 15).

Expression vectors, and administration of polynucleotide compositions are further described herein.

- 25 In another aspect, the invention provides a method of making any of the polynucleotides described herein.

Polynucleotides complementary to any such sequences are also encompassed by the present invention. Polynucleotides may be single-stranded (coding or antisense) or double-stranded, and may be DNA (genomic, cDNA or synthetic) or RNA molecules.
30 RNA molecules include HnRNA molecules, which contain introns and correspond to a DNA molecule in a one-to-one manner, and mRNA molecules, which do not contain introns. Additional coding or non-coding sequences may, but need not, be present

within a polynucleotide of the present invention, and a polynucleotide may, but need not, be linked to other molecules and/or support materials.

Polynucleotides may comprise a native sequence (i.e., an endogenous sequence that encodes an antibody or a portion thereof) or may comprise a variant of such a sequence. Polynucleotide variants contain one or more substitutions, additions, deletions and/or insertions such that the immunoreactivity of the encoded polypeptide is not diminished, relative to a native immunoreactive molecule. The effect on the immunoreactivity of the encoded polypeptide may generally be assessed as described herein. Variants preferably exhibit at least about 70% identity, more preferably, at least about 80% identity, yet more preferably, at least about 90% identity, and most preferably, at least about 95% identity to a polynucleotide sequence that encodes a native antibody or a portion thereof.

Two polynucleotide or polypeptide sequences are said to be "identical" if the sequence of nucleotides or amino acids in the two sequences is the same when aligned for maximum correspondence as described below. Comparisons between two sequences are typically performed by comparing the sequences over a comparison window to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window" as used herein, refers to a segment of at least about 20 contiguous positions, usually 30 to about 75, or 40 to about 50, in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned.

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted using the Megalign program in the Lasergene suite of bioinformatics software (DNASTAR, Inc., Madison, WI), using default parameters. This program embodies several alignment schemes described in the following references: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of

Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

Preferably, the "percentage of sequence identity" is determined by comparing two optimally aligned sequences over a window of comparison of at least 20 positions, wherein the portion of the polynucleotide or polypeptide sequence in the comparison window may comprise additions or deletions (i.e., gaps) of 20 percent or less, usually 5 to 15 percent, or 10 to 12 percent, as compared to the reference sequences (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. The percentage is calculated by determining the number of positions at which the identical nucleic acid bases or amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the reference sequence (i.e. the window size) and multiplying the results by 100 to yield the percentage of sequence identity.

Variants may also, or alternatively, be substantially homologous to a native gene, or a portion or complement thereof. Such polynucleotide variants are capable of hybridizing under moderately stringent conditions to a naturally occurring DNA sequence encoding a native antibody (or a complementary sequence).

Suitable "moderately stringent conditions" include prewashing in a solution of 5 X SSC, 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0); hybridizing at 50°C-65°C, 5 X SSC, overnight; followed by washing twice at 65°C for 20 minutes with each of 2X, 0.5X and 0.2X SSC containing 0.1 % SDS.

As used herein, "highly stringent conditions" or "high stringency conditions" are those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50 mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C. The skilled artisan will

recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

It will be appreciated by those of ordinary skill in the art that, as a result of the degeneracy of the genetic code, there are many nucleotide sequences that encode a polypeptide as described herein. Some of these polynucleotides bear minimal
5 homologous to the nucleotide sequence of any native gene. Nonetheless, polynucleotides that vary due to differences in codon usage are specifically contemplated by the present invention. Further, alleles of the genes comprising the polynucleotide sequences provided herein are within the scope of the present invention. Alleles are endogenous
10 genes that are altered as a result of one or more mutations, such as deletions, additions and/or substitutions of nucleotides. The resulting mRNA and protein may, but need not, have an altered structure or function. Alleles may be identified using standard techniques (such as hybridization, amplification and/or database sequence comparison).

The polynucleotides of this invention can be obtained using chemical synthesis,
15 recombinant methods, or PCR. Methods of chemical polynucleotide synthesis are well known in the art and need not be described in detail herein. One of skill in the art can use the sequences provided herein and a commercial DNA synthesizer to produce a desired DNA sequence.

For preparing polynucleotides using recombinant methods, a polynucleotide
20 comprising a desired sequence can be inserted into a suitable vector, and the vector in turn can be introduced into a suitable host cell for replication and amplification, as further discussed herein. Polynucleotides may be inserted into host cells by any means known in the art. Cells are transformed by introducing an exogenous polynucleotide by direct uptake, endocytosis, transfection, F-mating or electroporation. Once introduced,
25 the exogenous polynucleotide can be maintained within the cell as a non-integrated vector (such as a plasmid) or integrated into the host cell genome. The polynucleotide so amplified can be isolated from the host cell by methods well known within the art. See, e.g., Sambrook et al., 1989.

Alternatively, PCR allows reproduction of DNA sequences. PCR technology is
30 well known in the art and is described in U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,800,159, 4,754,065 and 4,683,202, as well as PCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullis et al. eds., Birkauser Press, Boston, 1994.

RNA can be obtained by using the isolated DNA in an appropriate vector and inserting it into a suitable host cell. When the cell replicates and the DNA is transcribed into RNA, the RNA can then be isolated using methods well known to those of skill in the art, as set forth in Sambrook et al., 1989, *supra*, for example.

5 Suitable cloning vectors may be constructed according to standard techniques, or may be selected from a large number of cloning vectors available in the art. While the cloning vector selected may vary according to the host cell intended to be used, useful cloning vectors will generally have the ability to self-replicate, may possess a single target for a particular restriction endonuclease, and/or may carry genes for a marker that
10 can be used in selecting clones containing the vector. Suitable examples include plasmids and bacterial viruses, e.g., pUC18, pUC19, Bluescript (e.g., pBS SK+) and its derivatives, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, phage DNAs, and shuttle vectors such as pSA3 and pAT28. These and many other cloning vectors are available from commercial vendors such as BioRad, Strategene, and Invitrogen.

15 Expression vectors generally are replicable polynucleotide constructs that contain a polynucleotide according to the invention. It is implied that an expression vector must be replicable in the host cells either as episomes or as an integral part of the chromosomal DNA. Suitable expression vectors include but are not limited to plasmids, viral vectors, including adenoviruses, adeno-associated viruses, retroviruses, cosmids,
20 and expression vector(s) disclosed in PCT Publication No. WO 87/04462. Vector components may generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence; an origin of replication; one or more marker genes; suitable transcriptional controlling elements (such as promoters, enhancers and terminator). For expression (i.e., translation), one or more translational controlling elements are also
25 usually required, such as ribosome binding sites, translation initiation sites, and stop codons.

 The vectors containing the polynucleotides of interest can be introduced into the host cell by any of a number of appropriate means, including electroporation, transfection employing calcium chloride, rubidium chloride, calcium phosphate, DEAE-dextran, or other substances; microprojectile bombardment; lipofection; and infection
30 (e.g., where the vector is an infectious agent such as vaccinia virus). The choice of introducing vectors or polynucleotides will often depend on features of the host cell.

 The invention also provides host cells comprising any of the polynucleotides

described herein. Any host cells capable of over-expressing heterologous DNAs can be used for the purpose of isolating the genes encoding the antibody, polypeptide or protein of interest. Non-limiting examples of mammalian host cells include but not limited to COS, HeLa, and CHO cells. See also PCT Publication No. WO 87/04462.

5 Suitable non-mammalian host cells include prokaryotes (such as *E. coli* or *B. subtilis*) and yeast (such as *S. cerevisiae*, *S. pombe*; or *K. lactis*). Preferably, the host cells express the cDNAs at a level of about 5 fold higher, more preferably, 10 fold higher, even more preferably, 20 fold higher than that of the corresponding endogenous antibody or protein of interest, if present, in the host cells. Screening the host cells for a
10 specific binding to IL-7R or an IL-7R domain is effected by an immunoassay or FACS. A cell overexpressing the antibody or protein of interest can be identified.

Compositions

The compositions used in the methods of the invention comprise an effective
15 amount of an antagonist IL-7R antibody, an antagonist IL-7R antibody derived polypeptide, or other IL-7R antagonists described herein. Examples of such compositions, as well as how to formulate, are also described in an earlier section and below. In some embodiments, the composition comprises one or more IL-7R antagonist antibodies. In other embodiments, the antagonist IL-7R antibody recognizes human
20 IL-7R α . In other embodiments, the antagonist IL-7R antibody is a human antibody. In other embodiments, the antagonist IL-7R antibody is a humanized antibody. In some embodiments, the antagonist IL-7R antibody comprises a constant region that is capable of triggering a desired immune response, such as antibody-mediated lysis or ADCC. In other embodiments, the antagonist IL-7R antibody comprises a constant
25 region that does not trigger an unwanted or undesirable immune response, such as antibody-mediated lysis or ADCC. In other embodiments, the antagonist IL-7R antibody comprises one or more CDR(s) of the antibody (such as one, two, three, four, five, or, in some embodiments, all six CDRs).

It is understood that the compositions can comprise more than one antagonist IL-
30 7R antibody (e.g., a mixture of antagonist IL-7R antibodies that recognize different epitopes of IL-7R). Other exemplary compositions comprise more than one antagonist IL-7R antibody that recognize the same epitope(s), or different species of antagonist IL-7R antibodies that bind to different epitopes of IL-7R.

The composition used in the present invention can further comprise pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers (Remington: The Science and practice of Pharmacy 20th Ed., 2000, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations, and may comprise buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (e.g. Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or polyethylene glycol (PEG). Pharmaceutically acceptable excipients are further described herein.

The antagonist IL-7R antibody and compositions thereof can also be used in conjunction with other agents that serve to enhance and/or complement the effectiveness of the agents.

D. Kits

The invention also provides kits for use in the instant methods. Kits of the invention include one or more containers comprising an IL-7R antagonist (such as, for example, a human antibody) described herein and instructions for use in accordance with any of the methods of the invention described herein. Generally, these instructions comprise a description of administration of the IL-7R antagonist for the above described therapeutic treatments.

In some embodiments, the IL-7R antagonist is an antagonist IL-7R antibody. In some embodiments, the antibody is a human antibody. In some embodiments, the antibody is a humanized antibody. In some embodiments, the antibody is a monoclonal

antibody. The instructions relating to the use of an antagonist IL-7R antibody generally include information as to dosage, dosing schedule, and route of administration for the intended treatment. The containers may be unit doses, bulk packages (e.g., multi-dose packages) or sub-unit doses. Instructions supplied in the kits of the invention are typically written instructions on a label or package insert (e.g., a paper sheet included in the kit), but machine-readable instructions (e.g., instructions carried on a magnetic or optical storage disk) are also acceptable.

The kits of this invention are in suitable packaging. Suitable packaging includes, but is not limited to, vials, bottles, jars, flexible packaging (e.g., sealed Mylar or plastic bags), and the like. Also contemplated are packages for use in combination with a specific device, such as an inhaler, nasal administration device (e.g., an atomizer) or an infusion device such as a minipump. A kit may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). The container may also have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is an antagonist IL-7R antibody. The container may further comprise a second pharmaceutically active agent.

Kits may optionally provide additional components such as buffers and interpretive information. Normally, the kit comprises a container and a label or package insert(s) on or associated with the container.

Mutations and Modifications

To express the IL-7R antibodies of the present invention, DNA fragments encoding VH and VL regions can first be obtained using any of the methods described above. Various modifications, e.g. mutations, deletions, and/or additions can also be introduced into the DNA sequences using standard methods known to those of skill in the art. For example, mutagenesis can be carried out using standard methods, such as PCR-mediated mutagenesis, in which the mutated nucleotides are incorporated into the PCR primers such that the PCR product contains the desired mutations or site-directed mutagenesis.

One type of substitution, for example, that may be made is to change one or more cysteines in the antibody, which may be chemically reactive, to another residue,

such as, without limitation, alanine or serine. For example, there can be a substitution of a non-canonical cysteine. The substitution can be made in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant region of an antibody. In some embodiments, the cysteine is canonical.

5 The antibodies may also be modified, e.g. in the variable domains of the heavy and/or light chains, e.g., to alter a binding property of the antibody. For example, a mutation may be made in one or more of the CDR regions to increase or decrease the K_D of the antibody for IL-7R, to increase or decrease k_{off} , or to alter the binding specificity of the antibody. Techniques in site-directed mutagenesis are well-known in
10 the art. See, e.g., Sambrook et al. and Ausubel et al., *supra*.

 A modification or mutation may also be made in a framework region or constant region to increase the half-life of an IL-7R antibody. See, e.g., PCT Publication No. WO 00/09560. A mutation in a framework region or constant region can also be made to
15 alter the immunogenicity of the antibody, to provide a site for covalent or non-covalent binding to another molecule, or to alter such properties as complement fixation, FcR binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. According to the invention, a single antibody may have mutations in any one or more of the CDRs or framework regions of the variable domain or in the constant region.

 In a process known as "germlining", certain amino acids in the V_H and V_L
20 sequences can be mutated to match those found naturally in germline V_H and V_L sequences. In particular, the amino acid sequences of the framework regions in the V_H and V_L sequences can be mutated to match the germline sequences to reduce the risk of immunogenicity when the antibody is administered. Germline DNA sequences for human V_H and V_L genes are known in the art (see e.g., the "Vbase" human germline
25 sequence database; see also Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson et al., 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836).

 Another type of amino acid substitution that may be made is to remove potential
30 proteolytic sites in the antibody. Such sites may occur in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant region of an antibody. Substitution of cysteine residues and removal of proteolytic sites may decrease the risk of heterogeneity in the antibody product and thus increase its homogeneity. Another type of amino acid

substitution is to eliminate asparagine-glycine pairs, which form potential deamidation sites, by altering one or both of the residues. In another example, the C-terminal lysine of the heavy chain of an IL-7R antibody of the invention can be cleaved. In various embodiments of the invention, the heavy and light chains of the IL-7R antibodies may optionally include a signal sequence.

Once DNA fragments encoding the VH and VL segments of the present invention are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes, or to a scFv gene. In these manipulations, a VL- or VH-encoding DNA fragment is operatively linked to another DNA fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

The isolated DNA encoding the VH region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the VH-encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG2 constant region. The IgG constant region sequence can be any of the various alleles or allotypes known to occur among different individuals, such as Gm(1), Gm(2), Gm(3), and Gm(17). These allotypes represent naturally occurring amino acid substitution in the IgG1 constant regions. For a Fab fragment heavy chain gene, the V_H-encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region. The CH1 heavy chain constant region may be derived from any of the heavy chain genes.

The isolated DNA encoding the VL region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the VL-encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, CL. The

sequences of human light chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat, E. A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR
5 amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region. The kappa constant region may be any of the various alleles known to occur among different individuals, such as Inv(1), Inv(2), and Inv(3). The lambda constant region may be derived from any of the three lambda genes.

To create a scFv gene, the VH- and VL-encoding DNA fragments are operatively
10 linked to another fragment encoding a flexible linker, e.g., encoding the amino acid sequence (Gly₄-Ser)₃, (SEQ ID NO: 16) such that the VH and VL sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the VL and VH regions joined by the flexible linker (See e.g., Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554.

15 The single chain antibody may be monovalent, if only a single VH and VL are used, bivalent, if two VH and VL are used, or polyvalent, if more than two VH and VL are used. Bispecific or polyvalent antibodies may be generated that bind specifically to IL-7R and to another molecule.

In another embodiment, a fusion antibody or immunoadhesin may be made that
20 comprises all or a portion of an IL-7R antibody of the invention linked to another polypeptide. In another embodiment, only the variable domains of the IL-7R antibody are linked to the polypeptide. In another embodiment, the VH domain of an IL-7R antibody is linked to a first polypeptide, while the VL domain of an IL-7R antibody is linked to a second polypeptide that associates with the first polypeptide in a manner
25 such that the VH and VL domains can interact with one another to form an antigen binding site. In another preferred embodiment, the VH domain is separated from the VL domain by a linker such that the VH and VL domains can interact with one another. The VH-linker- VL antibody is then linked to the polypeptide of interest. In addition, fusion antibodies can be created in which two (or more) single-chain antibodies are linked to
30 one another. This is useful if one wants to create a divalent or polyvalent antibody on a single polypeptide chain, or if one wants to create a bispecific antibody.

In other embodiments, other modified antibodies may be prepared using IL-7R antibody encoding nucleic acid molecules. For instance, "Kappa bodies" (Ill et al., 1997,

Protein Eng. 10:949-57), "Minibodies" (Martin et al., 1994, EMBO J. 13:5303-9), "Diabodies" (Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448), or "Janusins" (Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659 and Traunecker et al., 1992, Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52) may be prepared using standard molecular biological techniques following the teachings of the specification.

Bispecific antibodies or antigen-binding fragments can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments. See, e.g., Songsivilai & Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553. In addition, bispecific antibodies may be formed as "diabodies" or "Janusins." In some embodiments, the bispecific antibody binds to two different epitopes of IL-7R. In some embodiments, the modified antibodies described above are prepared using one or more of the variable domains or CDR regions from a human IL-7R antibody provided herein.

15 Generation of antigen-specific antibodies

Monoclonal antibodies raised against recombinant mouse IL-7R α /CD127/Fc chimera (R&D Systems Cat. No. 747-MR), and human antibodies obtained by biopanning a human naïve antibody library with recombinant IL-7R α were evaluated for their ability to bind mouse and human IL-7R. Antibodies were further screened for their ability to block IL-7-mediated STAT5 phosphorylation in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and/or monkey PBMCs. This manner of antibody preparation yielded antagonist antibodies that show blocking of IL-7-mediated STAT5 phosphorylation, as shown in Example 1.

Representative materials of the present invention were deposited in the American Type Culture Collection (ATCC) on February 9, 2011. Vector C1GM-VH having ATCC Accession No. PTA- is a polynucleotide encoding the C1GM heavy chain variable region, and vector C1GM-VL having ATCC Accession No. PTA- is a polynucleotide encoding the C1GM light chain variable region. The deposits were made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Pfizer, Inc. and

ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 U.S.C. Section 122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 C.F.R. Section 1.14 with particular reference to 886 OG 638).

The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, the materials will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

Examples

Example 1: Generating and Screening Antagonist IL-7R Antibodies

This example illustrates the generation and screening of antagonist IL-7R antibodies.

General procedures for immunization of animals for generating monoclonal antibodies:

A 2-month old female Sprague Dawley rat was immunized with 50 ug recombinant mouse IL-7R α /CD127/Fc chimera, which includes mouse IL-7R α (Glu21-Asp239), hCD33 signal peptide (Met 1-Ala 16), and human IgG (Pro100-Lys330) (R&D Systems Cat. No. 747-MR). The antigen was prepared for immunization by mixing 50 ug antigen in 100 ul PBS with 100 ul Sigma Adjuvant System (Cat. No. S6322). The antigen mixture was vortexed and injected into the hind footpads and peritoneum on days 0, 2, 5 and 7. On day 9, 50 ug of antigen without adjuvant was injected intravenously in a total volume of 150 ul in physiological saline. On day 13, the spleen cells were prepared as a single cell suspension and fused with P3x63Ag8.653 mouse

myeloma cells following a standard fusion protocol using 40% PEG 1500 (Boeringer Mannheim Biochemicals #783641). The fused cells were resuspended in medium containing 18% FBS, 2 mM L-glutamine, pen/strep, hypoxanthine, aminopterin and thymidine (HAT) (Sigma H0262) and 10% hybridoma fusion and cloning supplement (HFCS) (Cat. No. 11 363 735 001, Sigma), then plated out in 54 96-well plates at 200
5 ul/well. At day 7 after fusion, 150 ul of the medium was aspirated from each well, and the wells were re-fed with 200 ul of fresh medium. At day 11-13, supernatant from each well was tested for antibody to IL-7R and human Fc using ELISA (described below).

ELISA screening of antibodies:

10 Supernatant media from growing hybridoma clones were screened separately for their ability to bind the recombinant mouse (rm) IL-7R. The assays were performed with 96-well plates coated overnight with 50 μ l of a 1 μ g/ml solution of the antigen. Fifty-five coated plates were washed 4 times with PBS with 0.05% Tween and then 50 ul PBS with 0.5% BSA was added to each well. 5 ul from each well of the hybridoma plates
15 were added to the assay plates, and the plates were incubated at room temperature for 2 hrs to allow binding. Excess reagents were washed from the wells between each step with PBS containing 0.05% Tween-20. 50 ul horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat-anti mouse, F(ab')₂, Fc specific (Jackson #115-036-008) was added to bind to the mouse antibodies bound to the antigen. For detection, 50 ul ABTS, 2,2'-Azino-bis(3-
20 ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt was added as substrate. The plates were read after 30 mins at 405 nm using a Molecular Devices THERMOmax™ instrument. Hybridoma clones that secreted antibodies that were capable of binding to mouse IL-7R were selected for further analysis. These positive hybridoma supernatants were then collected from the hybridoma plates and tested in ELISA assays against
25 human Fc, goat anti rat IgM, and recombinant human (rh) IL-7R. Purified antibodies were then prepared for the antibodies that bound to rm IL-7R and antibodies that bound to both rm IL-7R and rh IL-7R.

General procedures for generating fully human monoclonal antibodies using phage display:

30 Anti-human IL-7R α human antibodies were isolated from a phage display human naïve scFv antibody library (Glanville G. et al., 2009, Proc Natl Acad Sci USA, 106(48):20216-20221) by a series of four rounds of bio-panning against human IL-7R α (R&D Systems®). For each round of panning, 1 ml IL-7R α (10 ug/ml in PBS) was

coated on an immunotube at 4°C overnight. The IL-7R α coated immunotube was washed three times with PBST. 10¹³ phage (1 ml) were added to the immunotube and incubated at room temperature for 1 hour to allow binding. After binding, the immunotube was washed eight times with PBST. Bound phage were eluted and used to
5 infect freshly grown TG1 cells. After the fourth round of panning, the positive binders were screened against both human IL-7R α and mouse IL-7R by ELISA. The antibodies binding to both human and mouse IL-7R were further studied for their affinities and blocking function, and antibodies were selected for affinity maturation.

In vitro functional assay:

10 Hybridoma clones secreting human or mouse IL-7R binding antibodies were expanded and supernatants were harvested. Total IgGs were purified from approximately 10 ml of the supernatant using protein A beads, dialyzed into PBS buffer, and the final volume reduced to yield solutions with 0.7-1 mg/ml of antibodies. Purified antibodies were then used to test their ability to block IL-7-mediated STAT5
15 phosphorylation in human PBMCs. For PBMC preparation, whole blood cells were collected through Ficoll gradient. Cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ in conical tubes (to prevent monocyte/macrophage adherence) for 1–2 h before stimulation with IL-2.

For the functional screening, human PBMCs were preincubated for 5 minutes
20 with test antibodies (10 μ g/ml) prior to addition of IL-7. A non-reactive isotype-matched antibody was used as a negative control (isotype control). Cells were stimulated with human IL-7 (0.1 ng/ml, R&D Systems®) for 15 minutes. To stop the IL-7 stimulation, formaldehyde was added directly to the culture medium to a final concentration of 1.6%. Cells were fixed for 15 min at room temperature. Methanol was then added directly to a
25 final concentration of 80%, and samples were stored at 4°C for 30 minutes to 1 hour before being immunostained. Cells were stained with anti-phospho-STAT5 (p-STAT) antibodies (BD Pharmingen, Y694 clone 47) and anti-CD4 antibodies (BD Pharmingen, RPA-T4). Using flow cytometry (LSRII, BD™ Biosciences), CD4+ gated cells were analyzed for p-STAT5 staining. Isotype control was set as 100% of p-STAT.

30 Figure 1 illustrates the effect of antagonist IL-7R fully human monoclonal antibodies P2D2 and P2E11, and HAL403a on IL-7-mediated STAT5 phosphorylation in human PBMCs. A mouse anti-human IL-7R monoclonal antibody, 13A2F4, was used as a positive control, and a nonreactive isotype-matched antibody was used as a

negative control (isotype control). Human PBMCs were preincubated for 5 minutes with each of the test antibodies or 13A2F4 at the following concentrations: 0.001, 0.01, 0.1, 1, and 10 µg/ml. The isotype control antibody was used at the highest concentration, 10 µg/ml. Cells were stimulated with human IL-7 (0.1 ng/ml) for 15 minutes, then fixed and immunostained as described above.

As measured by p-STAT5 staining, human antibodies P2D2, P2E11, HAL403a C1GM, C1GM-2 and C2M3 block human IL-7 mediated signaling in a dose-dependent manner (Figure 1 and data not shown). The isotype control was set as 100% p-STAT5 staining. At 10 µg/ml antibody HAL403a blocked STAT5 phosphorylation very effectively (Figure 1). C1GM, C1GM-2 and C2M3 blocked STAT5 phosphorylation comparable to HAL403a (data not shown).

The amino acid sequence of antagonist IL-7R antibody C1GM heavy chain (SEQ ID NO: 42) is shown below.

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEW
 VSLVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
 ARQGDYMGNNWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO: 42)

The amino acid sequence of antagonist IL-7R antibody C1GM light chain (SEQ ID NO: 43) is shown below.

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVI
 YEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHH
 LVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT
 VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC
 QVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 43)

The amino acid sequence of antagonist IL-7R antibody C1GM-2 heavy chain (SEQ ID NO: 45) is shown below.

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEW
VSLVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
5 ARQGDYMGNNWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFI
GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL
TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSR
10 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 45)

The amino acid sequence of antagonist IL-7R antibody C1GM-2 light chain (SEQ ID NO: 43) is shown below.

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVI
YEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHH
LVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT
VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWWSKSHRSYSC
20 QVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 43)

The amino acid sequence of antagonist IL-7R antibody HAL403a heavy chain (SEQ ID NO: 17) is shown below.

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWVRQAPGKGLEW
25 LSLVGWDGFFTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC
ARQGDYMGNNWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFI
GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVL
30 TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO: 17)

The amino acid sequence of antagonist IL-7R antibody HAL403a light chain (SEQ ID NO: 18) is shown below.

5 NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPNGNSPTTVI
 YEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLVTEDEADYYCQSYDFHH
 LVFGGGTKLTVLTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYAC
 EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 18)

10 Example 2: Determining Antibody Binding Affinity

This example illustrates the determination of antibody binding affinity for antagonist IL-7R antibodies.

The affinities of antagonist IL-7R antibodies to human IL-7R were measured on a surface plasmon resonance Biacore™ 2000 or 3000 biosensor equipped with a research-grade CM5 sensor chip (Biacore™ AB, Uppsala, Sweden – now GE Healthcare). Goat polyclonal anti-human F(ab')₂ fragments (Fc specific) were amine-coupled at saturating levels onto all four flow cells using a standard N-hydroxysuccinimide/ ethyldimethylaminopropyl carbodiimide (NHS/EDC) chemistry in HBS-P running buffer (from Biacore™). The buffer was switched to HBS-P containing 1 mg/mL BSA. Human IL-7R-hFc antigen (R&D systems, Minneapolis, USA) was diluted to about 30 µg/mL and captured for 3 min at 5 µL/min to give levels of about 500-1000 RU per flow cell, leaving one blank to serve as a reference channel. Fab, hlgG1, or hlgG2ΔA formats of the antibodies were injected in duplicates as a 5-membered 3-fold series starting at 2 µM and a 5-membered 4-fold series starting at 0.4 µM for 3 min at 20-50 µL/min. Dissociation was monitored for 5 min. The capture chip was regenerated after the last injection of each titration with two 30 sec pulses of 75 mM phosphoric acid or 10 mM Glycine-HCl pH 1.7. Buffer cycles provided blanks for double-referencing the binding response data, which were then fit globally to a simple reversible binding model using Biaevaluation software v.4.1 to deduce the kinetic association and dissociation rate constants, respectively k_a and k_d . Affinities were deduced from their ratio ($K_D = k_d/k_a$). The results in Table 4 show that these antibodies have picomolar or nanomolar affinities for human IL-7R.

Table 4

mAb	K _{on} for IL-7R (1/Ms)	K _{off} for IL-7R (1/S)	K _D for IL-7R (nM)
P3A9*	5.60E+04	1.14E-02	204
P4B3*	1.56E+04	3.51E-03	225
P2D2*	7.17E+04	8.82E-04	12
P2E11*	1.55E+05	4.97E-04	3
HAL403a*	5.07E+06	2.86E-04	0.06
HAL403b*	1.39E+06	8.08E-05	0.06
C1GM*	4.85 E+06	1.71E-04	0.04
C1GM**	1.42E+06	4.05E-04	0.286
C1GM-2***	1.51E+06	4.07E-04	0.270
C2M3**	1.41E+06	3.07E-04	0.218
C2M3***	1.55E+06	3.02E-04	0.195

* Fab; ** hlgG1; *** hlgG2ΔA

5 Example 4: Antagonist IL-7R Antibodies Reduce Disease Incidence in Non-obese diabetic (NOD) Animals, a Mouse Model for Type 1 Diabetes

This example illustrates the effect of antagonist IL-7R antibodies in a mouse model for type 1 diabetes.

To study the *in vivo* effect of antagonist IL-7R antibodies on the diabetogenic process, a rat anti-mouse antagonist IL-7R antibody, 28G9 (Rinat), was tested in NOD mice. NOD mice exhibit a susceptibility to spontaneous development of autoimmune insulin dependent diabetes mellitus (IDDM, type 1 diabetes) (Kikutani et al., 1992, Adv. Immunol. 51: 285–322). 28G9 blocks IL-7-mediated STAT5 phosphorylation in mouse splenocytes and cross-competes with antagonist IL-7R human antibodies C1GM, C2M3, HAL403a, HAL403b, P3A9, P4B3, P2D2 and P2E11 in Biacore™.

6-8 week old NOD female mice (The Jackson Laboratory) were injected intraperitoneally (i.p.) weekly starting at 9 weeks old (t = 0) with either 3 or 10 mg/kg body weight of 28G9. PBS or non-reactive isotype matched rat monoclonal antibody (isotype) were used as negative controls. The isotype antibody was administered at 10 mg/kg body weight. Mice were monitored two times per week for body weight and blood glucose. Diabetes was considered established when blood glucose level was at or over positive readings, i.e., over 250 mg/dL for two consecutive monitorings. The onset of diabetes was dated from the first of the sequential measurements.

As shown in Figure 2, none of the mice treated with 28G9 at 10 mg/kg developed

diabetes even at 18 weeks of age. In contrast, 75-80% of the PBS and isotype-treated mice developed diabetes (Figure 2). Although not all mice treated with 28G9 at 3 mg/kg were diabetes-free at the end of the study, a significantly reduced diabetes incidence compared to the PBS and isotype controls was observed, demonstrating the inhibitory effect of 28G9 on diabetes development was dose-dependent (Figure 2). Treatment with 28G9 at 10 mg/kg significantly reduced blood glucose level compared to isotype or PBS controls (Figure 3A). Mouse development during antagonist IL-7R antibody treatment was monitored by tracking body weight and mortality. As shown in Figure 3B, multiple dosing of 3 or 10 mg/kg 28G9 had no significant effect on mouse growth, and no mortality was found at 10 mg/kg. Thus, antagonist IL-7R antibodies reduce blood glucose levels and inhibit diabetes progression in NOD animals. These results demonstrate that antagonist IL-7R antibodies are effective in preventing and slowing the progression of type 1 diabetes.

To investigate the effect of antagonist IL-7R antibodies on peripheral T cell regulation, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were immunostained for the activation markers CD44 and CD62L and analyzed by flow cytometry. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated from the peripheral blood of PBS-treated, 28G9-treated, or isotype-treated mice. In comparison to the isotype control, the percentage of naïve CD8⁺ T cells (B220-CD8⁺CD44^{lo}CD62L^{hi}) in mice treated with 28G9 at 10 mg/kg was significantly lower, and the percentage of memory CD8⁺ T cells (B220-CD8⁺CD44^{hi}CD62L^{hi}) were significantly higher (Figures 4A and 4B). In contrast, naïve CD4⁺ T cells (B220-CD4⁺CD44^{lo}CD62L^{hi}) were not significantly depleted in antagonist IL-7R antibody treated mice compared to isotype control (Figure 5). These results indicate that antagonist IL-7R antibodies reduce blood glucose levels through naïve CD8⁺ T cell depletion.

Example 5: Antagonist IL-7R Antibodies Delay Onset of Autoimmune Disease

This example illustrates the effect of antagonist IL-7R antibodies in a mouse model for multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

The STAT5 activation assay was used to identify antagonist IL-7R antibodies. Spleens from B6 or BALB/c were homogenized in PBS and lysed in ACK lysis buffer (Invitrogen) for 2 min and then filtered through 100-µm pore size mesh, pelleted, and resuspended at 5×10^6 cells/ml in room temperature to 37°C RPMI 1640 containing 10%

FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), and L-glutamine. Cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ in conical tubes (to prevent monocyte/macrophage adherence) for 1–2 h before stimulation. Cells were preincubated with test antibody for 5 minutes prior to stimulation with IL-7. Cells were treated for 15 min with murine IL-7 (mIL-7, 0.1 ng/ml). Formaldehyde was added directly to the culture medium to a final concentration of 1.6%, and cells were fixed for 15 min at room temperature. Methanol was then added directly to a final concentration of 80%, and samples were stored at 4°C for 30 min to 1 h before immunostaining. The following antibodies were used for immunostaining: CD11b-FITC (M1/70), B220-Cy5.5PerCP, TCRβ-FITC, p-STAT5 (Y694, clone 47)-Alexa 647 (BD™ Pharmingen). TCRβ+ and CD11b+ cells were stained for phospho-STAT5. IL-7-stimulated STAT5 phosphorylation was observed by gating with TCRβ in flow cytometry. A number of antibodies that blocked STAT5 phosphorylation were identified, including monoclonal antibodies 28B6 and 28G9.

Active EAE was induced in 6- to 8-week-old female B6 mice by subcutaneous immunization with 100 µg of MOG_{35–55} peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO: 15)) emulsified in CFA containing 1 mg/ml of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco) on day 0 (see, Steinman and Zamvil, 2006). Additionally, mice received 400 ng of pertussis toxin (Calbiochem) i.v. in 0.1 ml of PBS on days 0 and 2. Starting on day 7 after MOG immunization, animals were treated twice weekly with antagonist IL-7R antibody 28B6 (10 mg/kg), antagonist IL-7R antibody 28G9 (10 mg/kg), or non-reactive isotype-matched antibody (10 mg/kg). Compared to isotype control, treatment with either 28G9 or 28B6 significantly reduced EAE activity as early as day 15 post immunization (Figure 6). This result demonstrates that antagonist IL-7R antibodies are effective in slowing the progression of EAE.

To test whether the antagonist IL-7R antibodies are efficacious in a dose-dependent manner, MOG immunized EAE animals were treated with either 1 or 3 mg/kg of 28G9 at day 7 and day 14 post immunization. A non-reactive isotype-matched antibody (1 mg/kg) was used as a negative control. In comparison to the isotype control, 28G9 treatment at both dosage levels reduced EAE severity at disease peak (Figure 7). This inhibitory effect of the antagonist IL-7R antibody lasted for about a week. This result demonstrates that antagonist IL-7R antibodies conferred protection at both 1 and 3 mg/kg. In a separate study, MOG immunized EAE animals were treated weekly with 1, 3 or 10 mg/kg of 28G9 starting at day 7. Mice treated with 28G9 at 1

mg/kg showed significant efficacy with no mortality (Figure 8). These results demonstrate that 1 mg/kg of antagonist IL-7R antibody treatment is effective in slowing the progression of EAE and is well-tolerated.

To investigate antagonist IL-7R antibody efficacy in established disease, MOG immunized EAE animals were treated twice weekly with 28G9 at 10 mg/kg starting day 14 after immunization. A non-reactive isotype-matched antibody (10 mg/kg) was used as a negative control. Compared to the control, treatment with antagonist IL-7R antibody significantly reduced EAE severity (Figure 9). No mortality with the antagonist IL-7R antibody observed. This result demonstrates that antagonist IL-7R antibodies are effective to ameliorate established, ongoing EAE.

To further determine whether antagonist IL-7R antibodies can reduce EAE at late intervention at lower dose, MOG immunized EAE animals were treated once weekly with 28G9 at 3mg/kg starting day 14 after immunization. A non-reactive isotype-matched antibody (3 mg/kg) was used as a negative control. Compared to the control, a highly significant reduction of disease severity was observed with antagonist IL-7R antibody treatment (Figure 10). This result demonstrates that antagonist IL-7R antibody treatment is effective to reduce disease activity even at late intervention and lower dose.

Example 6: Immunological Changes After Antagonist IL-7R Antibody Therapy in Autoimmune Disease

This example illustrates immunological changes in EAE mice after antagonist IL-7R antibody treatment.

To gain insight into the mechanisms by which antagonist IL-7R antibody acts to ameliorate EAE in the mouse model, lymphocyte populations from treated and control animals were analyzed by immunostaining and flow cytometry. For the immunological studies in this example, MOG immunized EAE animals were treated weekly with antagonist IL-7R antibody 28G9 (10 mg/kg), 28B6 (10 mg/kg) or vehicle (non-reactive isotype-matched antibody, 10 mg/kg). In selected studies, a group of MOG immunized EAE animals were treated weekly with 28B6 (10 mg/kg). Animals were sacrificed on day 21 after immunization, and central lymphoid organs were collected. Lymphocytes were prepared from the organs and stained as described below. Immunostained lymphocytes were analyzed by flow cytometry.

T cell populations in the BM, spleen, blood and thymus from EAE animals treated with antagonist IL-7R antibodies were significantly reduced compared to vehicle controls. As shown in Figure 11, both CD4 T cell (Figure 11A) and CD8 T cell (Figure 11B) populations from BM, spleen, blood and lymph nodes were significantly reduced in antagonist IL-7R antibody treated EAE animals. This is consistent with the role of IL-7R in both CD4 and CD8 T cell development. However, B cell populations were not significantly reduced in all of peripheral lymphoid organs. This result differs from the mouse genetic data from the IL-7R knockout, which lacks both T and B cells.

Because IL-7R signaling is critical for naïve T cell survival and for memory T cell proliferation, the effect of antagonist IL-7R antibodies in the regulation of peripheral T cells was analyzed by immunostaining using activation markers CD44 and CD62L. CD44^{lo}CD62L^{hi} represents naïve T cells, CD44^{hi}CD62L^{lo} represents activated T cells and CD44^{hi}CD62L^{hi} represent memory T cells. Compared to vehicle (nonreactive isotype-matched antibody) treated animals, antagonist IL-7R antibody treated mice had significantly depleted naïve T cell and activated T cell populations (Figures 12A and 12C). However, memory T cell populations were not significantly depleted (Figure 12B). This selective depletion of naïve and activated T cell populations may provide benefit in that naïve T cell depletion can block nascent autoAg-specific T cell activation, in turn preventing EAE. Memory T cells are not depleted, and thus, anti-infection immunity is preserved.

A reduction of NK cells in antagonist IL-7R antibody treated EAE animals was not observed. A slight increase in the percent of NK cells was observed, presumably due to the decreased percent of CD4 and CD8 T cells. This data is consistent with the observation that IL-7/IL-7R signaling regulates T cell, but not for NK cell, development.

To determine the effect of antagonist IL-7R antibody treatment on T_{reg} cell population in EAE animals, lymphocytes were stained for Foxp3 to identify T_{reg} cells and MOG-MHC class II (I-Ab) tetramer to detect MOG-specific T cells. The population of MOG-specific CD4⁺ T_{eff} cells detected in lymph nodes from 28G9 treated EAE animals was similar to that of control (nonreactive isotype-matched antibody-treated) animals (Figure 13, left graph). However, an increase in T_{reg} cell population was observed with 28G9 treatment (Figure 13, right graph). These results demonstrate that treatment of EAE animals with antagonist IL-7R antibody results in an increase of T_{reg} cell population.

Advantageously, antagonist IL-7R antibody treatment may not develop other inflammatory disease, a side effect observed with IL-2R α antibody therapy.

Lymphocyte preparation and immunofluorescent staining

5 For the above studies, single-cell leukocyte suspensions from spleens, peripheral lymph nodes (paired axillary, bronchial and inguinal), thymus and bilateral femurs bone marrow (BM) were generated by gentle dissection. Mononuclear cells from the central nervous system (CNS) were isolated after cardiac perfusion with PBS. Briefly, CNS
10 tissues were digested with collagenase D (2.5 mg/ml; Roche Diagnostics) and DNaseI (1 mg/ml; Roche Diagnostics) at 37°C for 45 minutes. Mononuclear cells were isolated by passing the tissue through 70- μ m cell strainers (BD Biosciences), followed by Percoll gradient (70%/37%) centrifugation. Lymphocytes were collected from the 37%/70% interface and washed. The following antibodies were used for immunostaining: FITC-, PE- or PE-Cy5-conjugated CD3 (17A2), CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7), CD62L
15 (MEL14), CD44 (IM7), B220 (H1.2F3), IgM (II/41), DX5 (CD49b) (all from BD Biosciences). For intracellular cytokine staining, lymphocytes were stimulated in vitro with phorbol 12-myristate 13-acetate (20 ng/ml; Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich) in the presence of GolgiStop™ (monensin) (5ug/ml) for 5 hours before staining. MOG₃₈₋₄₉/IAb tetramer and control tetramer (CLIP/IAb) were constructed and
20 supplied by the NIH Tetramer Core Facility. Background staining was assessed using nonreactive, isotype-matched control mAbs. For 2- or 3-color immunofluorescence analysis, single-cell suspensions (10⁶ cells) were stained at 4°C using predetermined optimal concentrations of mAb for 20 minutes. For tetramer staining, lymphocytes were stained for 3 hours at 37°C.

25

Example 7: Antagonist IL-7R Antibodies Ameliorate Glucose Intolerance in Diet-Induced Obesity (DIO) Animals

This example illustrates the effect of antagonist IL-7R antibodies in a mouse model for type 2 diabetes.

30 To study the *in vivo* effect of antagonist IL-7R antibodies on pre-established adipose inflammation in DIO mice, C57BL/6 male mice (The Jackson Laboratory) were fed a high fat diet (HFD, D12492, 60 Kcal% fat, Research Diets) beginning at six weeks old. After ten weeks of high fat diet, the 16-week-old obese mice were randomly

assigned to groups for i.p. administration of antagonist IL-7R antibody 28G9 (10 mg/kg), PBS, or nonreactive isotype-matched control antibody (10 mg/kg). Four days after antibody treatment, the mice were subject to a glucose tolerance test (i.p. 1 g/kg, after 16 hr fasting) to assess glucose intolerance. Table 5 shows the average body weight and glucose levels for each of the treated groups (PBS-, isotype- or 28G9-treated mice). The animals in each group had similar body weight.

Table 5

Treatment	Body weight (g)	Glucose (mg/dL) non-fasting/fasting
PBS	44.4	232/152.6
isotype	42.3	233/183.6
28G9	41.4	229/122.2

The results of the glucose tolerance test are depicted in Figure 14. Glucose intolerance induced by high fat diet was ameliorated by antagonist IL-7R antibody treatment. In the glucose tolerance test, DIO mice treated with 28G9 had significantly lower blood glucose levels compared to mice treated with isotype or PBS (Figure 14). This result demonstrates that antagonist IL-7R antibodies are efficacious in an animal model for type 2 diabetes.

Example 8: Antagonist IL-7R Antibodies Reduce Disease Severity in a Mouse Model for Rheumatoid Arthritis

This example illustrates the effect of antagonist IL-7R antibodies in a mouse model for rheumatoid arthritis (RA).

Collagen induced arthritis (CIA) is a widely used animal model sharing many pathological and histological similarities with RA. To study the *in vivo* effect of antagonist IL-7R antibodies on CIA, 6-8 week old male B10.RIII mice (stock # 000457, The Jackson Laboratory) were immunized with 150 ug of Type II collagen (Elastin Products) emulsified in Freund's complete adjuvant containing 4 mg/ml heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco) on day 0 and day 15. Mice were injected i.p. with 1, 3 or 10 mg/kg of antagonist IL-7R antibody 28G9 or nonreactive isotype-matched control antibodies on day -1, day 1, day 8, day 15 and day 22.

Clinical signs of CIA were assessed daily with a 0 to 5 point scoring system: 0, normal; 1, hind or fore paw joint affected or minimal diffuse erythema and swelling; 2,

hind or fore paw joints affected or mild diffuse erythema and swelling; 3, hind or fore paw joints affected or moderate diffuse erythema and swelling; 4, Marked diffuse erythema and swelling; 5, diffuse erythema and severe swelling entire paw, unable to flex digits. Treatment with 28G9 at 3 mg/kg significantly reduced the severity of CIA in CII-immunized mice as compared to isotype control (Figure 15). Treatment with 28G9 at 1 mg/kg did not show significant reduction. This result demonstrates that antagonist IL-7R antibodies are effective in slowing disease progression in an animal model for rheumatoid arthritis.

Example 9: Antagonist IL-7R Antibodies Reduce Disease Severity in a Mouse Model for Established EAE

This example illustrates efficacy of antagonist IL-7R antibodies in a mouse model for established EAE.

EAE was induced in SJL/J mice by immunization with 200 µg of PLP(p139-151) dissolved in complete Freund's adjuvant containing 4 mg/ml of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco Laboratories). Mice were examined daily for bodyweight measurements and clinical signs of EAE and scored as follows: 0, no paralysis; 1, loss of tail tone; 2, hindlimb weakness; 3, hindlimb paralysis; 4, hindlimb and forelimb paralysis; 5, moribund or dead.

Mice having a EAE clinical score of 2-3 were treated with 28G9 (10 mg/kg, i.p.), SB/14 (10 mg/kg, i.p.) or control IgG (10 mg/kg, i.p.) once a week for 2 weeks (on days 0, 7 and 14). 28G9 is rat IgG1 antibody and SB/14 (BD Biosciences) is a rat IgG2a antibody. Clinical scores were monitored daily until day 61.

By day 7, mice treated with 28G9 had clinical scores lower than 2 (N=7). The mice treated with 28G9 maintained clinical scores of about 2 until the end of the study (day 61). In comparison, the control IgG-treated animals had clinical scores between 3 and 4 throughout the study. No reduction of disease severity was observed with SB/14 treatment compared to the control.

A highly significant reduction of disease severity was observed in 28G9 antagonist IL-7R antibody treated animals. These results demonstrate that antagonist IL-7R antibodies are effective in reducing disease severity in established autoimmune disease.

Example 10: Antagonist IL-7R Antibodies Reduce Blood Glucose Levels in Animals with Newly Onset Diabetes

This example illustrates the efficacy of antagonist IL-7R antibodies in reversing newly onset diabetes in a mouse model for type 1 diabetes.

5 A panel of antagonist IL-7R antibodies were tested in a mouse model for type 1 diabetes. 28G9 is a rat IgG1 monoclonal antibody, 28G9-mlgG2a is an antibody having the 28G9 variable regions with mouse IgG2a constant region, and agly-28G9 is an aglycosylated antibody having the 28G9 variable regions with mouse IgG2a N297A. For construction and expression of 28G9-mlgG2a, the VH and Vk gene of rat monoclonal antibody 28G9 were amplified by PCR, cloned into pARC mouse IgG2a and pARC mouse kappa mammalian expression vectors, and cotransfected into 293F cells by Lipofectamin™ (Invitrogen™). After 5 days of post-transfection, the culture media was harvested and the 28G9 mouse IgG2a was purified by using Mabselect™ (GE) resin. For construction and expression of agly-28G9, the VH of rat 28G9 was cloned into an engineered pARC mouse IgG2a vector in which Asn-297 of the CH2 domain was replaced by Ala (pARC mouse IgG2a-N297A). An aglycosylated m28G9 (agly-28G9) was obtained by cotransfection of 293F cells with pARC mouse IgG2a-N297A and pARC-28G9 mouse kappa vector.

20 Spontaneous new onset diabetic NOD mice (i.e., two consecutive blood glucose concentrations over 250 mg/dl) were treated i.p. weekly with 28G9-mlgG2a (10 mg/kg, i.p.), 28G9 (10 mg/kg, i.p.), agly-28G9 (10 mg/kg, i.p.) or control IgG (10 mg/kg, i.p.). Blood glucose levels were monitored daily for 140 days after disease onset. In mice treated with 28G9-mlgG2a, 100% remission was observed. In the 28G9-mlgG2a treated NOD mice, blood glucose levels were maintained below 250 mg/dl with weekly 25 28G9-mlgG2a injections. 28G9 also showed some efficacy in reducing blood glucose levels compared to control IgG. Agly-28G9-treated and control IgG-treated mice had blood glucose levels of greater than 250 mg/dl throughout the study. These results demonstrate that 28G9-mlgG2a antagonist IL-7R antibody is highly effective in reducing blood glucose levels in mice with established type 1 diabetes.

30 In a separate study, spontaneous new onset diabetic NOD mice were treated weekly, beginning at disease onset, with 28G9-mlgG2a (10 mg/kg i.p.) for the number of doses indicated in Table 6. Blood glucose levels were monitored daily.

Table 6

Mouse	Age at disease onset (days)	Total # of doses	Days diabetes-free
1	140	3	117
2	190	2	89
3	210	3	145

The results shown in Table 6 indicate that two doses of antagonist IL-7R antibody were sufficient to maintain blood glucose levels lower than 250 mg/dL for up to 89 days. Three doses of antagonist IL-7R antibody were sufficient to maintain blood glucose levels lower than 250 mg/dL for at least 117 days. In this study, blood glucose levels maintained at lower than 250 mg/dL were observed for up to five months post-antagonist IL-7R antibody treatment.

The results of the studies described above demonstrate that antagonist IL-7R antibody 28G9-mIgG2a was highly effective in reducing blood glucose levels in animals with newly onset diabetes. Furthermore, mice treated with just two or three doses of antagonist IL-7R antibodies maintained blood glucose levels lower than 250 mg/dL for several months after antibody was administered.

Example 11: Antagonist IL-7R Antibodies Reduce Disease Severity in Mouse Models for Graft-Versus-Host Disease (GVHD)

This example illustrates the effect of antagonist IL-7R antibodies in mouse models for acute and chronic graft-versus-host disease (GVHD).

Acute GVHD

For the mouse model of acute GVHD, 10×10^6 human PBMC (freshly isolated) were injected into non-irradiated NOD.SCID IL2R $\gamma^{-/-}$ mice (The Jackson Laboratory, 8-12 weeks old). 14 days after injection, the mice were treated with 10 mg/kg antagonist antagonist IL-7R fully human IgG1 antibody HAL403b (n=10) or isotype control (n=10) once weekly. Clinical signs of GVHD and body weight were monitored twice a week. Forty days post-treatment, 100% of antagonist IL-7R antibody-treated animals remained alive, in contrast to only 50% of isotype control-treated animals survived. This result indicates that antagonist IL-7R antibodies are effective in reducing mortality rate in an animal model for acute GVHD.

Chronic GVHD

For the chronic GVHD mouse model, human cord blood cells containing a small (1-5%) percentage of CD3⁺ T cells were transplanted into newborn irradiated NOD.SCID IL2R γ ^{-/-} mice. Briefly, human CD34⁺ cord blood (AllCells, LLC, Emeryville, CA) was depleted of CD3⁺ T cells using human CD3 selection beads (Miltenyi Biotec
5 GmBH, Germany, CAT #130-050-101). For the transplantation, about 300,000 to 400,000 CD34⁺ cells containing about 1-5% CD3⁺ T cells (in a volume of 50 μ l) were intracardially injected per newborn irradiated NOD.SCID IL2R γ ^{-/-} mouse (The Jackson Laboratory). cGVHD developed 16-20 weeks post-transplantation.

Beginning at 24 weeks of age, mice with cGVHD were injected with 10 mg/kg
10 antagonist IL-7R fully human IgG1 antibody HAL403b (n = 4) or PBS (n = 4) once weekly until sacrifice.

Mice were sacrificed at about 28-32 weeks old, after about 4 to 8 weeks of antagonist IL-7R antibody or PBS treatment. Mice treated with antagonist IL-7R fully human IgG1 antibody had significantly less hair loss than mice injected with PBS.
15 Histologic analysis showed kidneys of PBS-treated mice were generally more severely affected than kidneys of antagonist IL-7R antibody-treated mice. For example, kidneys of control (PBS-treated) mice had markedly thickened capillary loops with increased amounts of eosinophilic material. In contrast, kidneys of mice treated with antagonist IL-7R antibody had mildly thickened capillary loops with increased amount of eosinophilic
20 material. In addition, kidneys of mice treated with antagonist IL-7R antibody had fewer dilated tubules compared to kidneys of mice treated with isotype control, which showed many dilated tubules. Lung histology revealed substantially reduced bronchial associated lymphoid tissue (BALT) in lungs of mice treated with antagonist IL-7R antibody compared to lungs of control mice, which had some BALT present. Severe
25 lymphoid atrophy was observed in spleen of mice treated with antagonist IL-7 R antibody, compared to the mild to moderate change in spleen of mice treated with PBS.

These results indicate that antagonist IL-7R antibodies are effective in reducing disease severity in an animal model for chronic GVHD.

30 Example 12: Antagonist IL-7R Antibodies Reduce Disease Severity in a Mouse Model for Lupus

This example illustrates the effect of antagonist IL-7R antibodies in a mouse model for lupus.

For the mouse model of lupus, MRL/MpJ-Fas^{lpr}/J mice (The Jackson Laboratory) were used. Commonly referred to as *lpr* mutants, these mice are homozygous for the lymphoproliferation spontaneous mutation (*Fas*^{lpr}) and show systemic autoimmunity, massive lymphadenopathy associated with proliferation of aberrant T cells, arthritis, and immune complex glomerulonephrosis. As such, the MRL/MpJ-Fas^{lpr}/J mice are useful as a model for systemic lupus erythematosus.

Beginning at the time of disease onset, mice were dosed i.p. weekly with 1, 3, or 10 mg/kg 28G9-mlgG2a antagonist IL-7R antibody (see Example 10), 1 mg/kg agly-28G9 antagonist IL-7R antibody, an isotype control IgG (negative control) or cyclophosphamide (positive control). For each treatment group, ten mice were used (n=10). Disease severity was monitored by measuring proteinuria levels, activity levels, and assessing the righting reflex. In assessing the righting reflex, mice that failed to right themselves within 30 seconds were sacrificed. Survival rate is summarized in Table 7 below.

Table 7

Treatment	Survival rate at 8 weeks after disease onset	Survival rate at 12 weeks after disease onset
1 mg/kg 28G9-mlgG2a	60%	50%
3 mg/kg 28G9-mlgG2a	80%	70%
10 mg/kg 28G9-mlgG2a	90%	80%
1 mg/kg agly-28G9	100%	100%
isotype control IgG (negative control)	60%	60%
cyclophosphamide (positive control)	80%	80%

As shown in Table 7, mice treated with 1 mg/kg agly-28G9, 3 mg/kg 28G9-mlgG2a or 10 mg/kg 28G9-mlgG2a had an increased survival rate compared to mice treated with isotype control IgG. These results indicate that antagonist IL-7R antibodies are effective in reducing disease severity in an animal model for lupus.

Example 13: Epitope Mapping/Binding of Antagonist IL-7R Antibodies

This example illustrates structure-guided mutagenesis to map antibody binding epitopes.

Based on the crystal structure of the IL-7/IL-7R α complex and the likely

involvement of certain residues in IL-7 binding (McElroy et al., 2009, *Structure*, 17(1):54-65, twenty-three IL-7R α surface-residue mutants (N29D, V58S, E59R, R66N, K77S, L80S, I82S, K84S, K100S, T105A, N131S, Q136K, K138S, Y139F, K141S, M144A, D190S, H191N, Y192A, Y192F, K194S, K194A and F196S) were chosen for mutation to map the antibody binding epitopes. The numbering for the mutants (i.e., N29D, V58S, E59R, etc.) follows the convention of post-processed protein wherein the first 20 amino acids are not counted.

A panel of IL-7R α single point mutants (his-tagged) were prepared as follows. The twenty-three IL-7R α single point mutants described above were generated from the previously described wild-type DNA construct (McElroy et al., 2009, *supra*) using standard DNA techniques. The mutant proteins were expressed using transient transfection in HEK293T cells and secreted into the cell media. The mutant proteins were purified by Ni²⁺ column chromatography. Protein concentrations were measured by spectrophotometry (NanoDrop™).

Interaction analysis of IL-7R α was performed at 25 °C using a surface-plasmon resonance-based ProteOn™ XPR36 biosensor equipped with a GLM sensor chip (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). HBST running buffer (10 mM Hepes pH7.4, 150 mM NaCl, 0.05% v/v Tween-20) was used throughout. Full-length IL-7R antibodies (HAL403a or HAL403b) were amine-coupled onto separate “vertical” channels of the chip via standard EDC/sulfo-NHS-mediated chemistry to levels of about 2000-5000 RU. The panel of IL-7R α mutants (including wild-type IL-7R α) was screened in the “horizontal” direction at 100 nM using association and dissociation phases of 3 and 10 mins respectively at 30 μ L/min. Surfaces were regenerated with 2/1 v/v Pierce immunopure elution buffer (pH2.8) /4M NaCl. Most injections were duplicated to confirm that the assay was reproducible.

Table 8 summarizes the impact of the single point mutations in the IL-7R α mutants on antibody binding compared to wild-type IL-7R α .

Table 8

IL-7R α mutant	Impact on antibody (HAL403a or HAL403b) binding
I82S	Highly impaired
K84S, K100S, T105A, Y192A	Impaired
D190S, H191N, K194S	Slightly impaired
N29D, V58S, E59R, R66N,	None

K77S, L80S, N131S, Q136K, K138S, Y139F, K141S, M144A, Y192F, K194A, F196S, (wild-type)	
---	--

The IL-7R α mutants displaying weakened antibody binding compared to wild-type IL-7R α were identified as having a point mutation at a residue involved in mAb binding. The binding residues of IL-7R α to antibody HAL403a in descending order of mutant effects were identified as follows: I82 (high impact on binding), K84 (medium impact), K100 (medium impact), T105 (medium impact), Y192 (medium impact), D190 (small impact), H191 (small impact), and K194 (small impact). The binding residues of IL-7R α to antibody HAL403b in descending order of mutant effects were identified as follows: I82 (high impact on binding), K84 (medium impact), K100 (medium impact), T105 (medium impact), Y192 (medium impact), D190 (small impact), H191 (small impact), and K194 (small impact).

Although the disclosed teachings have been described with reference to various applications, methods, kits, and compositions, it will be appreciated that various changes and modifications can be made without departing from the teachings herein and the claimed invention below. The foregoing examples are provided to better illustrate the disclosed teachings and are not intended to limit the scope of the teachings presented herein. While the present teachings have been described in terms of these exemplary embodiments, the skilled artisan will readily understand that numerous variations and modifications of these exemplary embodiments are possible without undue experimentation. All such variations and modifications are within the scope of the current teachings.

All references cited herein, including patents, patent applications, papers, text books, and the like, and the references cited therein, to the extent that they are not already, are hereby incorporated by reference in their entirety. In the event that one or more of the incorporated literature and similar materials differs from or contradicts this application, including but not limited to defined terms, term usage, described techniques, or the like, this application controls.

The foregoing description and Examples detail certain specific embodiments of the invention and describes the best mode contemplated by the inventors. It will be

appreciated, however, that no matter how detailed the foregoing may appear in text, the invention may be practiced in many ways and the invention should be construed in accordance with the appended claims and any equivalents thereof.

Claims

It is claimed:

- 5 1. An isolated interleukin-7 receptor (IL-7R) antibody which specifically binds to IL-7R and comprises an antigen binding region that cross-competes with a monoclonal antibody selected from the group consisting of P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a, HAL403b, C1GM and C2M3, for binding to IL-7R.
2. The antibody of claim 1, wherein the antibody binds to an epitope
10 comprising residues I82, K84, K100, T105, and Y192 of human interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α).
3. The antibody of claim 2, wherein the epitope further comprises one or more additional residues selected from the group consisting of residues D190, H191, and K194 of human IL-7R α .
- 15 4. An isolated antibody which specifically binds to interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence X₁X₂VMH, wherein X₁ is D or N; X₂ is S or Y (SEQ ID NO: 50), a VH CDR2 having the amino acid sequence X₁X₂X₃X₄X₅GX₆X₇TYADSVKG, wherein X₁ is L or A; X₂ is V or I;
20 X₃ is G or S; X₄ is W or G; X₅ is D or S; X₆ is F, G or S; X₇ is F, A or S (SEQ ID NO: 51), and a VH CDR3 having the amino acid sequence X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈, wherein X₁ is Q or D; X₂ is G or I; X₃ is D or S; X₄ is Y or G; X₅ is M, V or G; X₆ is G or F; X₇ is N, D or M; X₈ is N, Y or D (SEQ ID NO: 52), a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence TX₁SSGX₂IX₃SSYVQ wherein X₁ is R or G; X₂ is S or R ; X₃ is D
25 or A (SEQ ID NO: 53), a VL CDR2 having the amino acid sequence EDX₁QRPS wherein X₁ is D or N (SEQ ID NO: 54), and a VL CDR3 having the amino acid sequence X₁X₂YX₃X₄X₅X₆LX₇ wherein X₁ is Q or M; X₂ is S or Q; X₃ is D or A; X₄ is F or S; X₅ is H or S; X₆ is H or S; X₇ is V or W (SEQ ID NO: 55), wherein the antibody blocks STAT5 phosphorylation in a STAT5 activation assay.
- 30 5. An isolated antibody which specifically binds to interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region (VH)

complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence DSVMH (SEQ ID NO: 19), GFTFDDS (SEQ ID NO: 46), or GFTFDDSVMH (SEQ ID NO: 47), a VH CDR2 having the amino acid sequence LVGWDGFFTTYADSVKG (SEQ ID NO: 23) or GWDGFF (SEQ ID NO: 48), a VH CDR3 having the amino acid sequence QGDYMGNN (SEQ ID NO: 49), a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29), a VL CDR2 having the amino acid sequence EDDQRPS (SEQ ID NO: 31), and a VL CDR3 having the amino acid sequence QSYDFHHLV (SEQ ID NO: 36).

6. The antibody of claim 5, wherein the VH region comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 40 and the VL region comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 41.

7. The antibody of claim 6, wherein said antibody comprises a light chain having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 43 and a heavy chain having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 42, with or without the C-terminal lysine of SEQ ID NO: 42.

8. The antibody of any one of claims 1 to 6, wherein the antibody further comprises a constant region.

9. The antibody of claim 8, wherein the antibody is of the human IgG1 or IgG2Δa subclass.

10. A pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of claims 1 to 9.

11. A cell line that recombinantly produces the the antibody of any one of claims 1 to 9.

12. A nucleic acid encoding the antibody according to any one of claims 1 to 9.

13. A method for treating and/or preventing an autoimmune disorder in an individual, the method comprising administering a therapeutically effective amount of an antagonist IL-7R antibody to an individual suffering from or at risk for an autoimmune disorder, thereby ameliorating and/or preventing one or more symptoms of the

autoimmune disorder, wherein the autoimmune disorder is selected from the group consisting of type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, lupus and multiple sclerosis.

14. The method of claim 13, wherein administration of the antagonist IL-7R antibody results in reduced naïve and activated T cell populations in the individual
5 compared to before administration.

15. The method of claim 14, wherein the reduced T cell populations in the individual comprise T_H1 and/or T_H17 cells.

16. A method of treating and/or preventing type 2 diabetes in an individual, the method comprising administering a therapeutically effective amount of an IL-7R antagonist to an individual suffering from or at risk for type 2 diabetes, thereby
10 ameliorating and/or preventing one or more symptoms of type 2 diabetes.

17. The method of claim 16, wherein the IL-7R antagonist is an antagonist IL-7R antibody.

18. A method for treating and/or preventing graft-versus-host disease (GVHD) in an individual, comprising administering a therapeutically effective amount of an antagonist IL-7R antibody to an individual suffering from GVHD, thereby ameliorating one or more symptoms of GVHD.
15

19. The method of any one of claims 13-15, 17 or 18, wherein the antibody is the antibody of any one of claims 1 to 9.

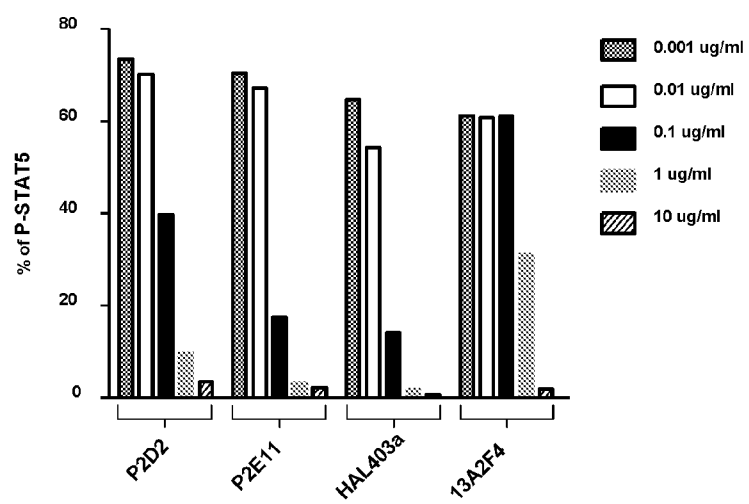


Figure 1

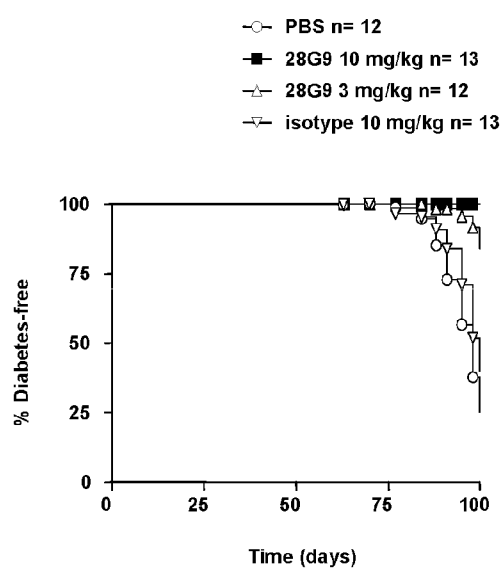


Figure 2

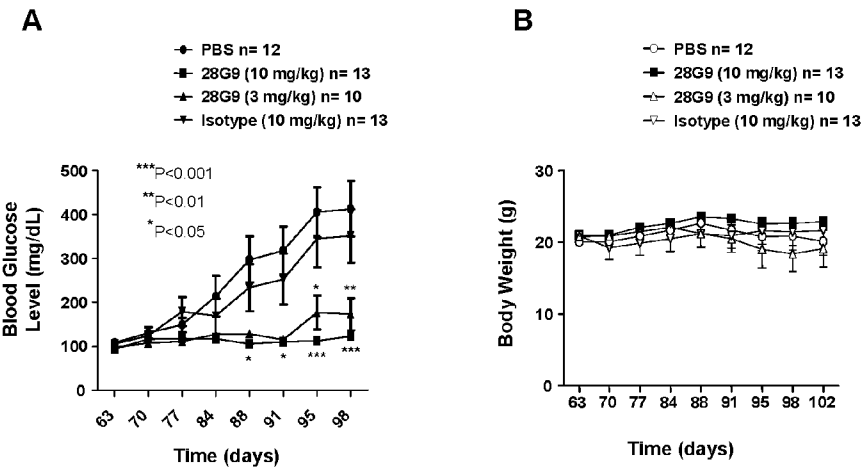


Figure 3

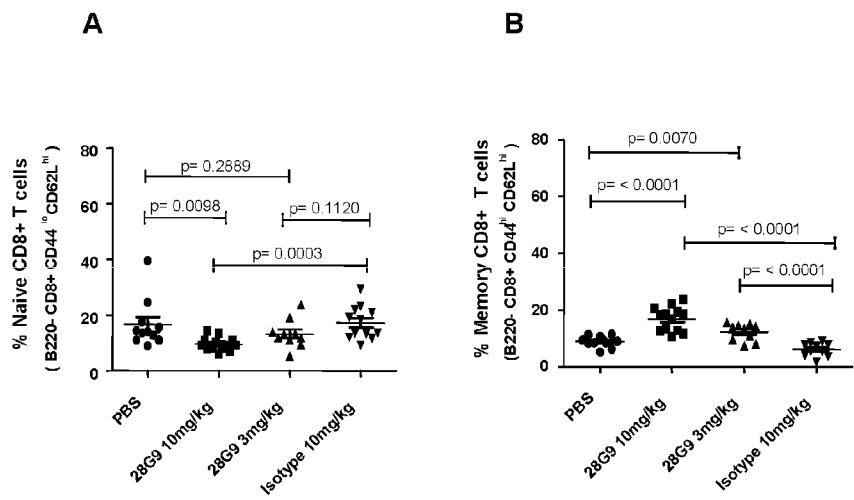


Figure 4

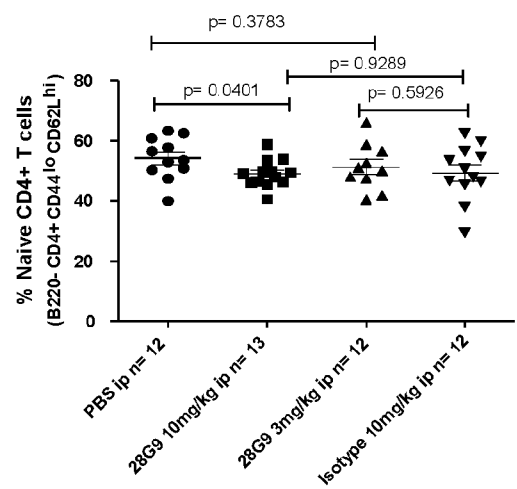


Figure 5

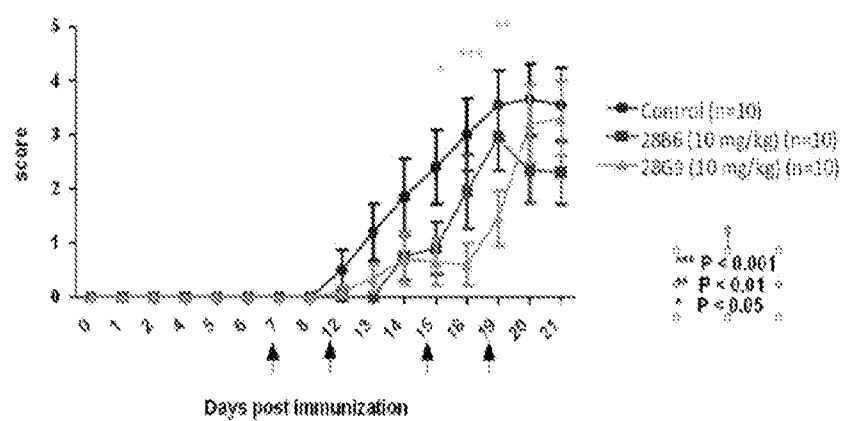


Figure 6

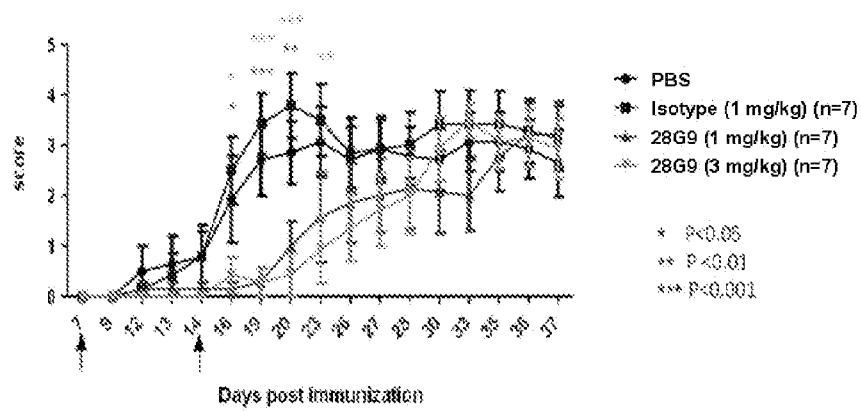


Figure 7

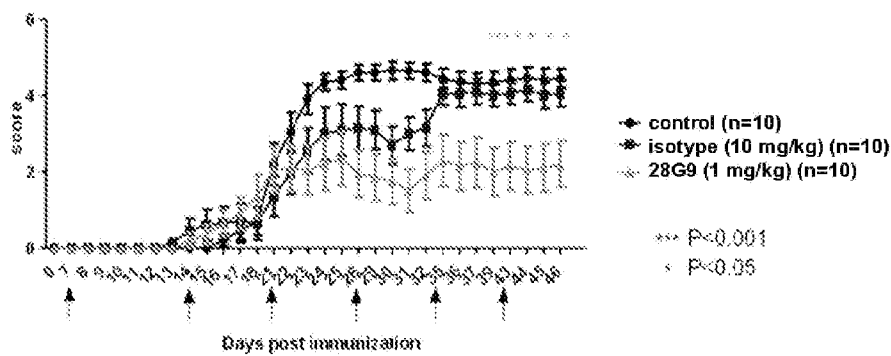


Figure 8

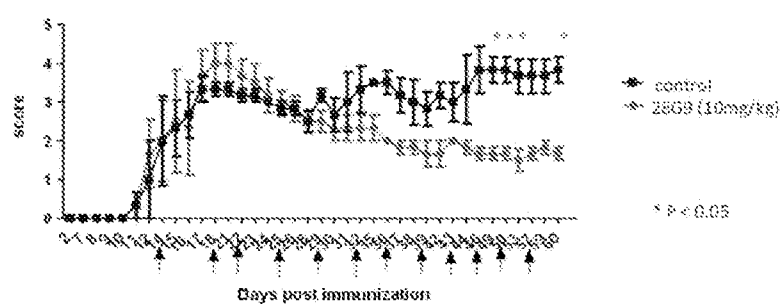


Figure 9

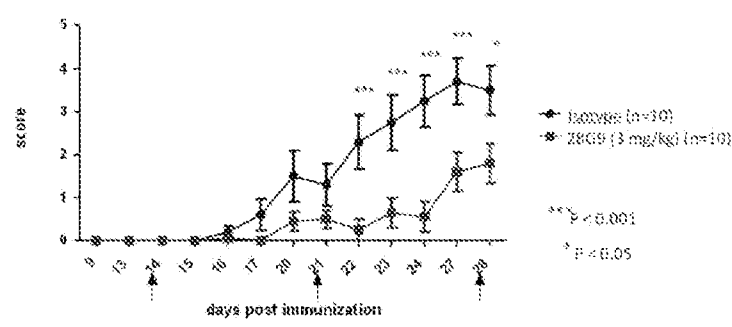


Figure 10

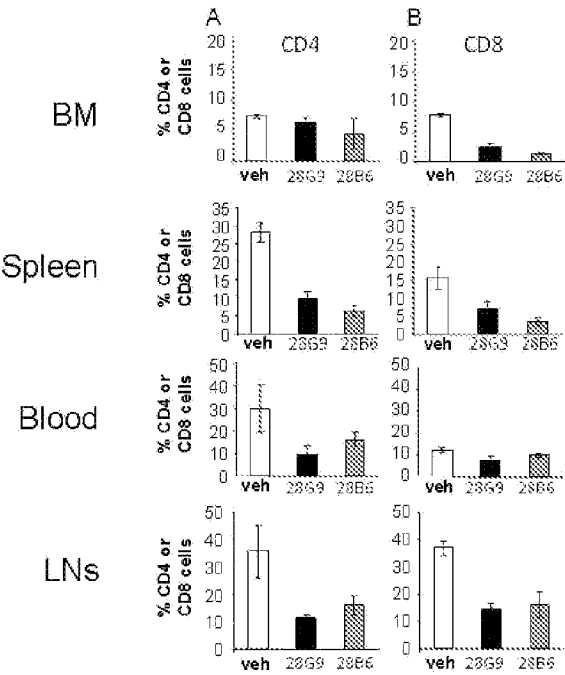


Figure 11

Figure 12A

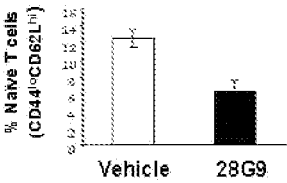


Figure 12B

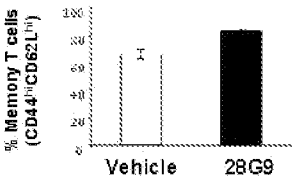
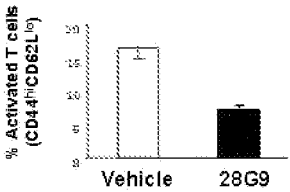


Figure 12C



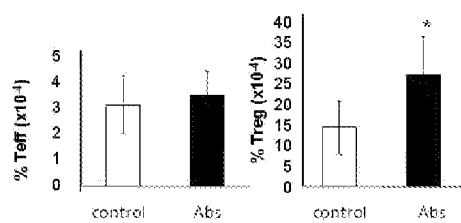


Figure 13

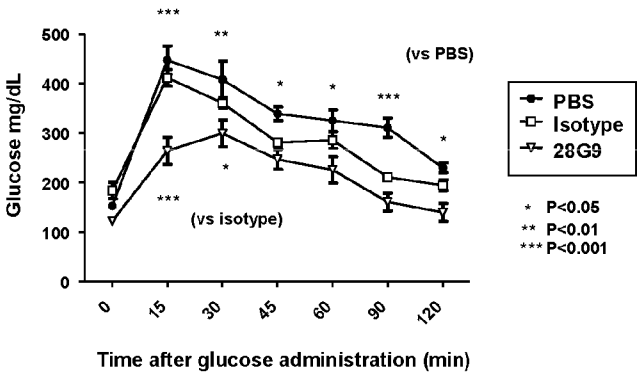


Figure 14

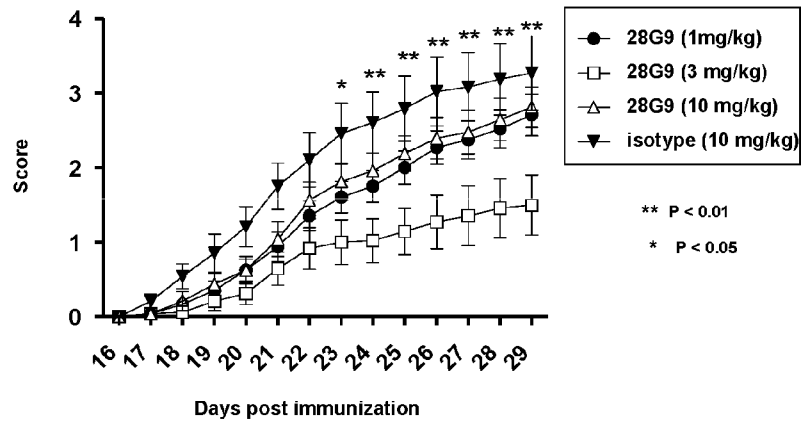


Figure 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/050792

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C12N15/13 A61K39/395 A61P37/00 A61P3/10
A61P37/06

ADD.

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)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/017468 A1 (GLAXO WELLCOME MFG PTE LTD [SG]; LEUNG STUART [CN]; LI LIXIN [CN]; LIU) 11 February 2010 (2010-02-11) page 38, line 10 - page 39, line 6; claims 1, 4-7,12,26; figure 8C; examples 2,3 -----	1-15,19
X	CHUNG BRILE ET AL: "Prevention of graft-versus-host disease by anti IL-7R.alpha. antibody", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 8, 15 October 2007 (2007-10-15), pages 2803-2810, XP002560035, ISSN: 0006-4971, DOI: DOI:10.1182/BLOOD-2006-11-055673 [retrieved on 2007-06-26] the whole document ----- -/-	18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* 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 document 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

11 July 2011

Date of mailing of the international search report

21/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weikl, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/050792

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2010/085643 A1 (UNIV MIAMI [US]; BETHEA JOHN R [US]; MALEK THOMAS H [US]) 29 July 2010 (2010-07-29) paragraphs [0062], [0 87], [0088], [0221], [0222] -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2011/050792

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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:

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.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12(completely); 19(partially)

Claims relating to isolated antagonistic interleukin-7 receptor antibodies P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a, HAL403b, C1GM and C2M3; compositions comprising such antibodies; nucleic acids encoding such antibodies; therapeutic methods employing such antibodies.

2. claims: 13-15(completely); 19(partially)

claims relating to the use of antagonistic IL-7R antibodies in the treatment of autoimmune diseases

3. claims: 16, 17(completely); 19(partially)

claims relating to the use of antagonistic IL-7R antibodies in the treatment of type 2 diabetes

4. claims: 18(completely); 19(partially)

claims relating to the use of antagonistic IL-7R antibodies in the treatment of graft-versus-host disease (GVHD)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/050792

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010017468	A1	11-02-2010	AR 072985 A1 06-10-2010
		AU 2009279471 A1 11-02-2010	
		CA 2733432 A1 11-02-2010	
		EP 2318442 A1 11-05-2011	
		KR 20110044777 A 29-04-2011	
		US 2010040616 A1 18-02-2010	
		UY 32038 A 26-03-2010	

WO 2010085643	A1	29-07-2010	NONE

ANTICUERPOS ANTAGONISTAS ANTI RECEPTOR DE IL-7 Y

PROCEDIMIENTOS

Campo

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

Antecedentes

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

IL-7R se expresa en células dendríticas y monocitos y parece actuar en
múltiples linajes hematopoyéticos (Reche PA, y col., J Immunol., 2001, 167:
25 336–43). En células dendríticas, IL-7R desempeña un papel inmunomodulador,

mientras que los linfocitos requieren señalización de IL-7R para su supervivencia, proliferación y diferenciación. Las rutas Jak-Stat y PI3K-Akt se activan por la unión de IL-7 a IL-7R (Jian y col., Cytokine Growth Factor Rev., 2005, 16: 513-533). Estas rutas implican interferencia de señalización,

5 dominios de interacción compartidos, bucles de retroalimentación, regulación génica integrada, multimerización y competición por ligando. Algunas dianas de la señalización de IL-7, incluyendo Bcl2 y Pyk2 contribuyen a la supervivencia celular. Otras dianas, tales como PI3 quinasa, la familia src de quinasas (lck y fyn) y STAT5, contribuyen a la proliferación celular. El factor de transcripción

10 STAT5 contribuye a la activación de múltiples genes cadena abajo diferentes en linfocitos B y T y puede contribuir a la recombinación de VDJ a través de la alteración de la estructura de la cromatina. Las señales de supervivencia celular y proliferación celular inducidas por IL-7 se combinan para inducir desarrollo de linfocitos T normal. Los detalles de la compleja red de

15 señalización de IL-7 y su interacción con otras cascadas de señalización en células del sistema inmune no se han elucidado completamente.

A partir de la información disponible en la técnica y antes de la presente invención, no estaba claro si la introducción de un anticuerpo antagonista de IL-7R en la circulación sanguínea para antagonizar de forma selectiva IL-7R sería

20 eficaz para tratar diabetes tipo 2, diabetes tipo 1, GVHD, lupus y artritis reumatoide y, si fuera así, qué propiedades de un anticuerpo para IL-7R se necesitan para dicha eficacia *in vivo*.

Sumario

Se proporcionan anticuerpos antagonistas que interaccionan selectivamente

25 con e inhiben la función de IL-7R. Se demuestra por primera vez que ciertos

anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces *in vivo* para tratar diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, artritis reumatoide, GVHD y lupus.

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

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

En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al receptor de interleucina-7 α (IL-7R α) y comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos X₁X₂VMH, en la que X₁ es D o N; X₂ es S o Y (SEC ID N°: 50), una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos

$X_1X_2X_3X_4X_5GX_6X_7TYYADSVKG$, en la que X_1 es L o A; X_2 es V o I; X_3 es G o S; X_4 es W o G; X_5 es D o S; X_6 es F, G o S; X_7 es F, A o S (SEC ID N°: 51), y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, en la que X_1 es Q o D; X_2 es G o I; X_3 es D o S; X_4 es Y o G; X_5 es M, V o G; X_6 es G o F; X_7 es N, D o M; X_8 es N, Y o D (SEC ID N°: 52), una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos $TX_1SSGX_2IX_3SSYVQ$ en la que X_1 es R o G; X_2 es S o R; X_3 es D o A (SEC ID N°: 53), una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos EDX_1QRPS en la que X_1 es D o N (SEC ID N°: 54) y una CDR3 de VL que tiene la

5 secuencia de aminoácidos $X_1X_2YX_3X_4X_5X_6LX_7$ en la que X_1 es Q o M; X_2 es S o Q; X_3 es D o A; X_4 es F o S; X_5 es H o S; X_6 es H o S; X_7 es V o W (SEC ID N°: 55), en la que el anticuerpo bloquea la fosforilación de STAT5 en un ensayo de activación de STAT5. En algunas realizaciones, la reacción flanqueante entre CDR2 de VH y CDR3 de VH comprende la secuencia de aminoácidos alanina-

10 arginina, en la que la arginina está adyacente al primer resto aminoacídico de CDR3 de VH. En algunas realizaciones, la reacción flanqueante entre CDR2 de VH y CDR3 de VH comprende la secuencia de aminoácidos cisteína-alanina-

15 arginina, en la que la arginina está adyacente al primer resto aminoacídico de CDR3 de VH.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región de contacto con CDR de cadena pesada uno que tiene la secuencia de aminoácidos X_1X_2VMH , en la que X_1 es D o N; X_2 es S o Y (SEC ID N°: 50), una región de contacto con CDR de cadena pesada dos que tiene la secuencia de aminoácidos $GWDGFF$ (SEC ID N°: 57) y una región de contacto con CDR

25 de cadena pesada tres que tiene la secuencia de aminoácidos $ARX_1X_2X_3X_4$

(SEC ID N°: 58), una región de contacto de CDR de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SGSIDSSY (SEC ID N°: 59), una región de contacto de CDR de cadena ligera dos que tiene la secuencia de aminoácidos EDDQRPSGV (SEC ID N°: 60) y una región de contacto de CDR de cadena ligera tres que tiene la secuencia de aminoácidos FHHL (SEC ID N°: 61), en la que el anticuerpo bloquea la fosforilación de STAT5 en un ensayo de activación de STAT5.

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

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

de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 23 o 48 y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 49 o una variante de las mismas que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en CDR1, CDR2 y/o CDR3.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a IL-7R α y comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 19, 46 o 47, una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 23 o 48, y una CDR3 de VH que tiene
- 10 la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 49, una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 29, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 31 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 36. En algunas realizaciones, la región
- 15 VH comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWVSLV GWDGFFTTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDY MGNNWGQGTLVTVSS (SEC ID N°: 40) y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos
- 20 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDD QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTK LTVL (SEC ID N°: 41). En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos
- NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTT
- 25 VIYEDDQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHHLV

FGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA
 DSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV
 EKTVAPECS (SEC ID N°: 43) y una cadena pesada que tiene la secuencia de
 aminoácidos

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWVSLV
 GWDGFFTYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDY
 MGNWVGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 10 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 42) con o sin la lisina C-terminal de SEC
 ID N°: 42.

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

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

En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica
 25 que comprende un anticuerpo que interacciona selectivamente con e inhibe la

función de IL-7R.

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

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

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

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

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

25 En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para prevenir

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

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

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

En algunas realizaciones, la GVHD es GVHD crónica o GVHD aguda.

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

En algunas realizaciones, el lupus es lupus eritematoso cutáneo, lupus
25 eritematoso sistémico, lupus eritematoso o neonatal inducido por fármacos.

En algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar esclerosis múltiple en un individuo. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que necesite dicho

5 tratamiento, previniendo o tratando de este modo uno o más síntomas de esclerosis múltiple y reduciendo y/o agotando las poblaciones de linfocitos T activados y/o vírgenes en el individuo. En algunas realizaciones, las poblaciones de linfocitos T reducidas o agotadas en el individuo comprenden linfocitos T_H1 y/o T_H17 . En algunas realizaciones, la administración del

10 anticuerpo antagonista de IL-7R no da como resultado la expansión de la población de linfocitos T_H17 en el individuo.

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

Breve Descripción de las Figuras/Dibujos

15 La Figura 1 representa el efecto dependiente de dosis de los anticuerpos monoclonales antagonistas de IL-7R P2D2, P2E11 y HAL403a en fosforilación de STAT5 mediada por IL-7 en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). El eje de las x indica el porcentaje de linfocitos CD4+ que expresan fosfo-STAT5 (p-STAT).

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

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

25 (g) en ratones NOD.

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

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

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

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

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

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

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

- 25 La Figura 11 representa el efecto de los anticuerpos monoclonales antagonistas de IL-7R 28G9 28B6 en poblaciones de (A) linfocitos T CD4 y (B)

linfocitos T CD8 de medula ósea (MO), bazo, sangre y ganglios linfáticos (GL) de animales con EAE. Para el eje de las x la población de linfocitos total se estableció como 100%.

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

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

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

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

Descripción Detallada

Se desvelan en el presente documento anticuerpos que antagonizan la función de IL-7R, incluyendo su interacción con IL-7. Se proporcionan procedimientos para preparar anticuerpos antagonistas de IL-7R, composiciones que comprenden estos anticuerpos y procedimientos para usar

estos anticuerpos como un medicamento. Pueden usarse antagonistas de IL-7R, por ejemplo, anticuerpos antagonistas de IL-7R en la prevención y/o tratamiento de diabetes tipo 2, GVHD y trastornos autoinmunes, incluyendo esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide, diabetes tipo 1 y lupus.

5 Técnicas Generales

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook y col., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis y col., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan y col., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989);

Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

5 Definiciones

Un “anticuerpo” es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se

10 usa en el presente documento, el término abarca no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) y de dominio (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de tiburón y de camélido) y proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo y cualquier otra

15 configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de los mismos) y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la región constante o sus cadenas

20 pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se

25 llaman alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de

las subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien.

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

Como se usa en el presente documento, anticuerpo “humanizado” se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de

las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Preferentemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan

5 restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor con restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de regiones flanqueantes Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos

10 correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que no se hallan en el anticuerpo receptor ni en las secuencias flanqueantes o CDR importadas, pero se incluyen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos una, y

15 típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una parte de una región o dominio constante de

20 inmunoglobulina (Fc), típicamente el de una inmunoglobulina humana. Se prefieren anticuerpos que tienen las regiones Fc modificadas como se describe en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2 CDR L3, CDR H1, CDR H2 o CDR H3) que se alteran con respeto al anticuerpo original, que también se

25 denominan una o más CDR "derivadas de" una o más CDR del anticuerpo

original.

Como se usa en el presente documento, “anticuerpo humano”, significa un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que se ha preparado
5 usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos conocida por los expertos en la materia o desveladas en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humano o al menos un polipéptido de cadena ligera humano. Un ejemplo tal es un anticuerpo que
10 comprende polipéptidos de cadena ligera murina y de cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la materia. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos, expresando esa biblioteca de fagos anticuerpos humanos (Vaughan y col, 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314;
15 Sheets y col, 1998, Proc Natl Acad. Sci. (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom y Winter, 1991, J. Mol Biol, 227:381; Marks y col., 1991, J. Mol Biol, 222:581). También pueden prepararse anticuerpos humanos por inmunización de animales en los que se han introducido de forma transgénica loci de inmunoglobulina humana en lugar de los loci endógenos, por ejemplo, ratones
20 en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Este enfoque se describe en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016. Como alternativa, el anticuerpo humano puede prepararse mediante inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un
25 antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden

haberse inmunizado *in vitro*). Véase, por ejemplo, Cole y col. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77, 1985; Boerner y col, 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; y Patente de Estados Unidos Nº 5.750.373.

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

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

Los anticuerpos antagonistas de IL-7R abarcan anticuerpos que bloquean, antagonizan, suprimen o reducen (hasta cualquier grado, incluyendo de forma significativa) la actividad biológica de IL-7R, incluyendo rutas cadena abajo mediadas por señalización de IL-7R, dicha interacción con IL-7 y/o inducción de una respuesta celular a IL-7. Para el fin de la presente invención, se entenderá explícitamente que la expresión “anticuerpo antagonista de IL-7R” (denominado de forma intercambiable “anticuerpo antagonista de IL-7R”, “anticuerpo anti-IL-7R antagonista” o “anticuerpo antagonista anti-IL-7R”) abarca todos las expresiones, títulos y características y estados funcionales

anteriormente identificados por lo que el IL-7R en sí mismo, una actividad biológica de IL-7R (incluyendo sin limitación la interacción con IL-7, su capacidad para mediar cualquier aspecto de la fosforilación de STAT5, activación de la ruta de fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)-Akt, regulación negativa de p27^{Kip1}, regulación positiva de Bcl-2, hiperfosforilación de Rb y regulación positiva de CXCR4) o las consecuencias de la actividad biológica, sustancialmente se anulan, disminuyen o neutralizan en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista de IL-7R se une IL-7R y evita la interacción con IL-7. Se proporcionan ejemplos de anticuerpos antagonistas de IL-7R en el presente documento.

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

Los términos “polipéptido”, “oligopéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a las cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, preferentemente, relativamente cortas (por ejemplo, 10-100 aminoácidos). La cadena puede ser lineal o ramificada, puede comprender aminoácidos modificados y/o puede interrumpirse por no

aminoácidos. Los términos también abarcan una cadena de aminoácidos que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un
5 componente marcador. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que los polipéptidos pueden aparecer como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

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

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

(“amidato”), P(O)R, P(O)OR’, CO o CH₂ (“formacetal”), en los que cada R o R’ es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que contienen opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o aralilo. No todos los enlaces en un polinucleótido tienen que
 5 ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos indicados en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

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

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

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

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

exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferente.

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

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

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

de una inmunoglobulina generalmente comprende dos regiones constantes, CH2 y CH3.

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

El término “competir” como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o una parte de unión a antígeno de mismo, se une a un epítipo de un modo suficientemente similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una parte de unión a antígeno del mismo, de modo que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo afín disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo a su epítipo disminuye también de forma detectable en presencia del primer

anticuerpo puede, pero no necesita, ser el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo con su epítopo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo con su epítopo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la
5 unión del otro anticuerpo con su epítopo o ligando afín, en igual, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos “compiten de forma cruzada” entre sí por la unión de su epítopo o epítopos respectivos. Los anticuerpos que compiten y que compiten de forma cruzada están abarcados por la presente invención. Independientemente del organismo por el que suceda dicha
10 competición o competición cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítopo común o parte del mismo), el experto en la materia apreciará, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que dichos anticuerpos que compiten y/o compiten de forma cruzada están abarcados y pueden ser útiles para los procedimientos
15 develados en el presente documento.

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

25 Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de

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

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

la incidencia o mejora de uno o más síntomas de la artritis reumatoide, reducción de la incidencia o mejora de uno o más síntomas de GVHD, reducción de la incidencia o mejora de uno o más síntomas del lupus, y reducción de la incidencia o mejora de uno o más síntomas de la esclerosis múltiple.

“Reducción de la incidencia” significa cualquiera de reducción de gravedad (que puede incluir reducción de la necesidad de y/o cantidad de (por ejemplo exposición a) otros fármacos y/o terapias generalmente usadas para esta afección. Como entienden los expertos en la materia, los individuos pueden variar en términos de su respuesta al tratamiento y, como tal, por ejemplo, un “procedimiento para reducir la incidencia” refleja administrar el antagonista de IL-7R basándose en una expectativa razonable de que dicha administración causará probablemente tal reducción en la incidencia en ese individuo particular.

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

Como se usa en el presente documento, una “dosificación eficaz” o “cantidad eficaz” de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para efectuar uno o más resultados beneficiosos o deseados cualesquiera. Para uso profiláctico, los resultados beneficiosos o deseados, incluyen eliminar o reducir el riesgo, disminuir la gravedad, o retardar la aparición de la enfermedad, incluyendo síntomas bioquímicos, histológicos y/o de comportamiento de la enfermedad, sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios que se presentan durante el desarrollo de la

enfermedad. Para su uso terapéutico, los resultados beneficiosos o deseados incluyen resultados clínicos tales como reducir niveles de glucosa en sangre, reducir la incidencia o mejora de uno o más síntomas de diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2, artritis reumatoide, GVHD, lupus o esclerosis múltiple, 5 disminuir la dosis de otras medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, mejorar el efecto de otra medicación y/o retardar la progresión de la enfermedad de los pacientes. Una dosificación eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los propósitos de la presente invención, una dosificación eficaz del fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una 10 cantidad suficiente para conseguir tratamiento profiláctico o terapéutico directa o indirectamente. Como se entiende en el contexto clínico, una dosificación eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no conseguirse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. De este modo, una “dosificación eficaz” puede considerarse en el contexto de 15 administrar uno o más agentes terapéuticos y puede considerarse suministrar un agente sencillo en una cantidad eficaz si junto uno o más agentes adicionales, puede alcanzarse o se alcanza un resultado deseable.

Un “individuo” o un “sujeto” es un mamífero, más preferentemente, un ser humano. Los mamíferos también incluyen, sin limitación, animales de 20 granja, animales deportivos, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

Como se usa en el presente documento, “vector” significa una construcción, que es capaz de suministrar y, preferentemente, expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula huésped. Los ejemplos de 25 vectores incluyen, sin limitación, vectores virales, vectores de expresión de

ADN o ARN desnudo, plásmidos, cósmidos o vectores de fagos, vectores de expresión de ADN o ARN asociados con agentes de condensación catiónica, vectores de expresión de ADN o ARN encapsulados en liposomas y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

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

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

- 25 El término “ k_{on} ”, como se usa en el presente documento, se refiere a la

constante de velocidad para la asociación de un antígeno con un anticuerpo. Específicamente, las constantes de velocidad (K_{on} y K_{off}) y las constantes de disociación en equilibrio se miden usando fragmentos Fab de anticuerpos (es decir univalentes) e IL-7R.

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

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

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

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

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

reivindicada.

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

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

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

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

individuo, comprendiendo el procedimiento administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de IL-7R. En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir GVHD en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un antagonista de
5 IL-7R.

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

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

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

En algunas realizaciones, la administración terapéutica del antagonista
25 de IL-7R da como resultado de forma ventajosa una incidencia reducida y/o

mejora de uno o más síntomas de esclerosis múltiple incluyendo, por ejemplo sin limitación, parálisis de las extremidades, temblores, dificultad al caminar, dificultad al tragar, ceguera, visión borrosa y debilidad muscular.

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

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

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

gastrointestinal.

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

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

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

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

Un individuo que padece GVHD puede tratarse con una antagonista de IL-7R tal como, por ejemplo, un anticuerpo antagonista de IL-7R. Un individuo adecuado para terapia con antagonista de IL-7R se selecciona usando criterios clínicos e indicadores de pronóstico de GVHD que se conocen bien en la técnica. El diagnóstico o evaluación de GVHD está bien establecido en la

técnica. Los ensayos para GVHD habitualmente dependen de los síntomas, pero pueden incluir endoscopia gastrointestinal, con o sin una biopsia, ensayos de las funciones hepáticas (aumentarán los niveles de AST, ALP y bilirrubina), biopsia del hígado, rayos X de los pulmones y/o biopsia cutánea. Los
5 elementos suficientes para establecer el diagnóstico de GVHD crónica incluyen, por ejemplo sin limitación, esclerosis, lesiones de tipo liquen plano, poiquiloderma, redes esofágicas, fascitis y bronqueolitis obliterans (véase, por ejemplo, Leet y Flowers, Hematology, enero de 2008; 2008:134-141). Puede medirse GVHD aguda de hígado mediante, por ejemplo, el nivel de bilirrubina
10 en pacientes con enfermedad aguda. La GVHD cutánea aguda puede dar como resultado una erupción maculopapular difusa. La evaluación de la gravedad de GVHD puede realizarse basándose en medidas conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la mejora, control, reducción de la incidencia de o retardo del desarrollo o progresión de GVHD y/o síntomas de GVHD se
15 miden por el grado global (piel-hígado-intestino) con cada órgano evaluado individualmente desde un mínimo de 1 a un máximo de 4. En algunas realizaciones, la mejora, control, reducción de la incidencia o retardo del desarrollo o progresión de GVHD y/o síntomas de GVHD se miden mediante control de peso corporal.

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

en combinación con otros procedimientos convencionales de tratamiento.

El antagonista de IL-7R puede administrarse a un individuo mediante cualquier vía adecuada. Debería resultar evidente para un experto en la materia que los ejemplos descritos en el presente documento no pretenden ser limitantes sino ilustrativos de las técnicas disponibles. En consecuencia, en algunas realizaciones, el antagonista de IL-7R se administra a un individuo de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo como una embolada o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, transdérmica, subcutánea, intraarticular, sublingual, intrasinovial, mediante insuflación, intratecal, oral, por inhalación o tópicas. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, administración intravenosa o localizada. Los nebulizadores disponibles en el mercado para formulaciones líquidas, incluyendo nebulizadores a chorro y nebulizadores ultrasónicos son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas pueden nebulizarse directamente y puede nebulizarse polvo liofilizado después de la reconstitución. Como alternativa, un antagonista de IL-7R puede formarse en aerosol usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida o inhalarse como un polvo liofilizado y molido.

En una realización un antagonista de IL-7R se administra mediante técnicas de suministro específico de sitio o local dirigido. Los ejemplos de técnicas de suministro específico de sitio o local dirigido incluyen diversas fuentes de depósito implantable del antagonista de IL-7R o catéteres de suministro local, tales como catéteres de infusión, catéteres permanentes o catéteres de aguja, injertos sintéticos, vendajes adventicios, shunt y

endoprótesis vasculares u otros dispositivos implantables, vehículos específicos de sitio, inyección directa o aplicación directa. Véase, por ejemplo, la Publicación de PCT N° WO 00/53211 y la Patente de Estados Unidos N° 5.981.568.

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

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

Un antagonista de IL-7R puede administrarse usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo por inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía subcutánea, vía intramuscular, etc.). Los anticuerpos de IL-7R también pueden administrarse mediante inhalación, como

5 se describe en el presente documento. Generalmente, para la administración de los anticuerpos de IL-7R, una dosificación de candidato inicial puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. Para el propósito de la presente invención, una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente cualquiera de 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más,

10 dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede usarse una dosificación de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento se

15 prolonga hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas o hasta que se consiguen niveles terapéuticos suficientes, por ejemplo, para reducir los niveles de glucosa en sangre. Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo

20 de IL-7R o seguido de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada dos semanas. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles dependiendo del patrón de desintegración farmacocinética que el facultativo desea conseguir. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se contempla la dosificación de una a cuatro veces por semana. En otras

25 realizaciones, se contempla la dosificación una vez al mes o una vez cada dos

meses o cada tres meses. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el antagonista o los antagonistas de IL-7R usados) puede variar a lo largo del tiempo.

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

liberación prolongada en la técnica.

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

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

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

25 Las formulaciones terapéuticas del antagonista de IL-7R usadas de

acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mediante mezcla de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing, 5 2000), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro sódico; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y 10 metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; parabenos de alquilo, tales como parabeno de metilo o de propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); 15 proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, 20 trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de proteína-Zn); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Los liposomas que contienen el antagonista de IL-7R se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein, y 25 col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688, 1985; Hwang, y col., Proc. Natl Acad.

Sci. USA 77: 4030, 1980; y las Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y 4.544.545. Se desvelan liposomas con tiempo de circulación mejorado en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles por el procedimiento de evaporación de fase inversa con
5 una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

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

Pueden prepararse preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el
20 anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos modelados, por ejemplo películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, acetato de
25 vinilo-etileno no degradable, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico

degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), isobutirato de acetato de sacarosa y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

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

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

Para la preparación de composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico, por ejemplo ingredientes de formación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato
20 de magnesio, fosfato dicálcico o gomas y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se denominan estas composiciones de preformulación como homogéneas,
25 significa que el principio activo se dispersa uniformemente por toda la

composición de modo que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas farmacéuticas unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide después en formas farmacéuticas unitarias del tipo descrito anteriormente que

5 contienen de 0,1 a aproximadamente 500 mg del principio activo de la presente invención. Los comprimidos o píldoras de la nueva composición pueden revestirse o formar compuestos de otro modo para proporcionar una forma farmacéutica que proporciona la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente

10 farmacéutico interno y uno farmacéutico externo, estando el segundo en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente externo pase intacto al duodeno o que se retarde en su liberación. Puede usarse una diversidad de materiales para tales capas o

15 revestimientos entéricos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular agentes no iónicos, tales como polioxietilensorbitanos (por ejemplo TweenTM 20, 40, 60, 80

20 u 85) y otros sorbitanos (por ejemplo SpanTM 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo comprenderán convenientemente entre 0,05 y 5% de agente tensioactivo y puede estar entre el 0,1 y 2,5%. Se apreciará que pueden añadirse otros ingredientes, por ejemplo manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si fuera necesario.

25 Las emulsiones adecuadas pueden prepararse usando emulsiones

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

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

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables o mezclas de los mismos y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha expuesto anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por la vía respiratoria, oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferentemente estériles pueden nebulizarse mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente del dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede unirse a una

máscara facial, tienda o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en solución, suspensión o polvo, preferentemente por vía oral o nasal a partir de dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

5 Antagonistas de IL-7R

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

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

En algunas realizaciones, el antagonista de IL-7R es un anticuerpo antagonista de IL-7R. Para los fines de la presente invención, el anticuerpo antagonista de IL-7R preferentemente reacciona con IL-7R α de una manera que inhibe la función de señalización de IL-7R y la interacción con IL-7. En

algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R reconoce específicamente IL-7R de primate. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista de IL-7R se une a IL-7R de primate y roedor.

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

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

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

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región

constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, es decir, que tiene un potencial reducido para provocar una respuesta inmune. En algunas realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624; solicitud de PCT N° PCT/GB99/01441; y/o solicitud de Patente de Reino Unido N° 9809951.8. El Fc puede ser IgG1 humano, IgG2 humano o IgG4 humano. El Fc puede ser IgG2 humano que contiene la mutación A330P331 a S330S331 (IgG2Δa), en la que los restos aminoacídicos se enumeran con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo silvestre. Eur. J. Immunol., 1999, 29: 2613-2624. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG₄ que comprende las siguientes mutaciones (Armour y col., 2003, Molecular Immunology 40 585-593): E233F234L235 a P233V234A235 (IgG4Δc), en la que la numeración está en referencia a IgG4 de tipo silvestre. En otra realización más, la Fc es IgG4 humana E233F234L235 a P233V234A235 con deleción en G236 (IgG4Δb). En otra realización la Fc es cualquier Fc de IgG4 humana (IgG4, IgG4Δb o IgG4Δc) que contiene una mutación bisagra estabilizante S228 a P228 (Aalberse y col., 2002, Immunology 105, 9-19). En otra realización, la Fc puede ser Fc aglucosilada.

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

glucosilación.

La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo antagonista de IL-7R a IL-7R (tal como IL-7R humano) puede ser de aproximadamente 0.002 a aproximadamente 200 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es
 5 cualquiera de aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM o aproximadamente 2
 10 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menor de cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5
 15 pM, o aproximadamente 2 pM.

Un modo de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos con IL-7R es mediante la medición de la afinidad de unión de los fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede escindirse con
 20 papaína o expresarse de forma recombinante. La afinidad de un fragmento Fab de IL-7R de un anticuerpo puede determinarse por resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore™3000™, Biacore™, INC, Piscataway NJ) equipada con microplacas sensoras de estreptavidina preinmovilizada (SA) usando tampón de ejecución
 25 HBS-EP (HEPES 0,01M, pH 7,4, NaCl 0.15, EDTA 3 mM, P20 tensioactivo al

0,005% v/v). Puede diluirse IL-7R humano biotinilado (o cualquier otro IL-7R) en tampón HBS-EP hasta una concentración de menos de 0,5 µg/ml e inyectarse a lo largo de los canales de la microplaca individuales usando tiempos de contacto variables, para conseguir dos intervalos de densidad de
5 antígeno, 50-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados o 800-1.000 UR para ensayos de exploración. Los estudios de regeneración han mostrado que NaOH 25 mM en etanol al 25% v/v retira de forma eficaz el Fab unido mientras que mantiene la actividad de IL-7R en la microplaca durante más de 200 inyecciones. Típicamente, se inyectan
10 diluciones en serie (que abarcan concentraciones de 0,1-10x de K_D estimada) de muestras de Fab purificadas durante 1 minuto a 100 µl/minuto y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan mediante ELISA y/o electroforesis de SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (como se determina mediante análisis de
15 aminoácidos) como un patrón. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) cinéticas se obtienen simultáneamente mediante el ajuste de los datos globalmente a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la
20 constante de disociación en equilibrio (K_D) se calculan como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para su uso en la determinación de la afinidad de unión de un anticuerpo con cualquier IL-7R, incluyendo IL-7R humano e IL-7R de otro mamífero (tal como IL-7R de ratón, IL-7R de rata, IL-7R de primate) así como diferentes formas de IL-7R. La afinidad de unión de un anticuerpo
25 generalmente se mide a 25°C, pero también puede medirse a 37°C.

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

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

Pueden prepararse hibridomas a partir de células de mieloma inmortalizadas y de linfocitos usando la técnica de hibridación de células somáticas general de Kohler, B. y Milstein, C., 1975, Nature 256:495-497 o
20 como se modificó por Buck, D. W., y col., In Vitro, 18:377-381, 1982. Pueden usarse en la hibridación líneas de mieloma disponibles, incluyendo sin limitación X63-Ag8.653 y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., Estados Unidos. Generalmente, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides usando un fusógeno tal como polietilenglicol o
25 por medios eléctricos bien conocidos para los expertos en la materia. Después

de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se cultivan en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio de hipoxantina-aminopterinatimidina (HAT), para eliminar las células parentales no hibridadas. Cualquiera de los medios descritos en el presente documento complementados con o sin
5 suero, pueden usarse para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, pueden usarse linfocitos B inmortalizados EBV para producir los anticuerpos monoclonales de IL-7R de la presente invención. Los hibridomas se expanden y subclonan, si se desea, y se ensayan los sobrenadantes con respecto a
10 actividad anti-inmunógeno mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo de enzimas o inmunoensayo de fluorescencia).

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

Los hibridomas que producen tales anticuerpos pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los medios de cultivo o fluidos corporales, mediante
20 procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, puede eliminarse, por ejemplo, mediante la ejecución de la preparación sobre adsorbentes preparados del inmunógeno unido a fase sólida
25 y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La

inmunización de un animal huésped con un IL-7R α humano o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada con una proteína que es inmunógena en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja que usa un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂ o R¹N=C=NR, en el que R y R¹ son grupos alquilo diferentes, puede producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

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

En una alternativa la secuencia polinucleotídica puede usarse para manipulación genética para “humanizar” el anticuerpo o para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede modificarse por ingeniería genética para asemejarse de forma más cercana a regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmune si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede

ser deseable manipular genéticamente la secuencia del anticuerpo para obtener una mayor afinidad con IL-7R y mayor eficacia en la inhibición de IL-7R. Resultará evidente para un experto en la materia que uno o más cambios de polinucleótidos pueden realizarse al anticuerpo antagonista de IL-7R y
 5 mantener aún su capacidad de unión a IL-7R.

Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y aminoácidos predicha de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región
 10 flanqueante del anticuerpo usar durante el proceso de humanización (3) las propias metodologías/técnicas de humanización y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

15 Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivadas de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificado y sus CDR asociadas fusionadas con regiones constantes humanas. Véase, por ejemplo, Winter y col. Nature 349: 293-299,
 20 1991, Lobuglio y col. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 4220-4224, 1989, Shaw y col. J Immunol. 138: 4534-4538, 1987, y Brown y col. Cancer Res. 47: 3577-3583, 1987. Otras referencias describen CDR de roedor introducidas en una región flanqueante (FR) de soporte humana antes de la fusión con una región constante de anticuerpo humano apropiada. Véase, por ejemplo, Riechmann y
 25 col. Nature 332: 323-327, 1988, Verhoeyen y col. Science 239: 1534-1536,

1988, y Jones y col. Nature 321: 522-525, 1986. Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por regiones flanqueantes de roedor modificadas por ingeniería genética de forma recombinante. Véase, por ejemplo, Publicación de Patente Europea N° 0519596. Estas moléculas “humanizadas” se diseñan para

5 minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia las moléculas de anticuerpo antihumano de roedor que limita la duración y eficacia de aplicaciones terapéuticas de estos restos en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante del anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética de modo que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, no desencadena lisis del

10 complemento). Véase, por ejemplo Publicación de PCT N° PCT/GB99/01441; Solicitud de Patente de Reino Unido No. 9809951.8. Otros procedimientos para humanizar anticuerpos que también pueden utilizarse se desvelan en Daugherty y col., Nucl. Acids Res. 19: 2471-2476, 1991, y en las Patentes de Estados Unidos N° 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y

15 6.350.861; y en la Publicación de PCT N° WO 01/27160.

Resulta evidente que aunque el análisis anterior se refiere a anticuerpos humanizados, los principios generales analizados son aplicables a la adaptación de anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Resulta evidente adicionalmente que uno o más

20 aspectos de la humanización de un anticuerpo descrito en el presente documento pueden combinarse, por ejemplo, inserción de CDR, mutación de región flanqueante y mutación de CDR.

En otra alternativa más, pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos mediante el uso de ratones disponibles en el mercado que se han

25 modificado por ingeniería genética para expresar proteínas inmunoglobulinas

humanas específicas. Los animales transgénicos que se diseñan para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo anticuerpos completamente humanos) o más robusta también pueden usarse para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Son ejemplos de dicha tecnología

5 Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante y expresarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma

10 recombinante mediante tecnología de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Wintery y col., Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455, 1994. Como alternativa, la tecnología de presentación de fagos (McCafferty y col., Nature 348: 552-553, 1990) puede usarse para producir anticuerpos humanos y

15 fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo se clonan en fase en un gen de proteína de cubierta mayor o menor de bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcional en la superficie

20 de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. De este modo, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La

25 presentación de fagos puede realizarse en una diversidad de formatos; para

revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571, 1993. Varias fuentes de segmentos de gen de V pueden usarse para la presentación de fagos. Clackson y col., *Nature* 352: 624-628, 1991, aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona

5 de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes de V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Mark y col., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597,

10 1991, o Griffith y col., *EMBO J.* 12: 725-734, 1993. En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una alta tasa (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad y los linfocitos B que presentan inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican preferentemente y se diferencian durante la

15 presentación de antígenos posterior. Este proceso natural puede imitarse mediante el empleo de la técnica conocida como “redistribución de cadena” (Marks y col., *Bio/Technol.* 10: 779-783, 1992). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos “primarios” obtenidos por presentación de fagos puede mejorarse mediante el reemplazo secuencial de los genes de la

20 región V de cadena pesada y ligera con variantes de origen natural (repertorios) de genes de dominio V obtenidos de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de pM-nM. Una estrategia para preparar repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes (también conocidos como “la

25 madre de todas las bibliotecas”) se ha descrito por Waterhouse y col., *Nucl.*

Acids Res. 21:2265-2266, 1993. La redistribución de genes también puede usarse para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedores, cuando el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se

5 denomina “impronta de epítipo”, el gen de dominio V de cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedor obtenido por técnica de presentación de fagos se reemplaza con un repertorio de genes de dominio V humanos, creando quimeras de roedor-humano. La selección de antígenos da como resultado el

10 aislamiento de regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítipo rige (imprime) la selección de compañero. Cuando el procedimiento se repite para reemplazar el dominio V del roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (Véase Publicación de PCT N° WO 93/06213). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedor mediante inserción de CDR, esta técnica proporciona

15 anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos flanqueantes o de CDR del origen de roedor.

Los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante primero aislando los anticuerpos y las células productoras de anticuerpos de los animales huésped, obteniendo la secuencia génica y usando la secuencia

20 génica para expresar el anticuerpo de forma recombinante en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que puede emplearse es expresar la secuencia del anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han desvelado procedimientos para expresar anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, y col.

25 Vaccine 19:2756, 2001; Lonberg, N. y D. Huszar. Int. Rev. Immunol 13:65,

1995; y Pollock, y col., J Immunol Methods 231:147, 1999. Los procedimientos para preparar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena sencilla, etc. se conocen en la técnica.

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

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

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos
20 monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión (tales como vectores de expresión desvelados en la Publicación de PCT N° WO 87/04462), que se transfectan después en células huésped tales como células de *E. coli*, células de COS de simio, células de ovario de hámster chino
25 (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína

inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N° WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, 1984, o mediante la unión covalente con la secuencia codificante de inmunoglobulina a toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos “quiméricos” o “híbridos” que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal de IL-7R en el presente documento.

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

inhibición acompañante de la fosforilación de STAT5.

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

Los anticuerpos antagonistas de IL-7R pueden caracterizarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento es identificar el epítipo al que se une o “mapeo de epítipos”. Existen muchos procedimientos conocidos en la técnica para mapear y caracterizar la localización de epítipos en proteínas, incluyendo resolver la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmento génico y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo de epítipos puede usarse para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo antagonista de IL-7R. El mapeo de epítipos está disponible en el mercado de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Países Bajos). El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en un tramo único de aminoácidos o un epítipo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que pueden no estar necesariamente contenidos en un tramo único. Péptidos de diversas longitudes (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud)

pueden aislarse o sintetizarse (por ejemplo, de forma recombinante) y usarse para ensayos de unión con un anticuerpo antagonista de IL-7R. En otro ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo antagonista de IL-7R puede determinarse en una exploración sistemática mediante el uso de péptidos

5 solapantes derivados de la secuencia de IL-7R y determinando la unión por el anticuerpo antagonista de IL-7R. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos génicos, la fase abierta de lectura que codifica IL-7R se fragmenta aleatoriamente o mediante construcciones genéticas específicas y la reactividad de los fragmentos expresados de IL-7R con el anticuerpo a ensayar

10 se determinan. Los fragmentos génicos pueden, por ejemplo, producirse por PCR y después transcribirse y traducirse a proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos de IL-7R marcados de forma radiactiva se determina después mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítipos también pueden

15 identificarse mediante el uso de grandes bibliotecas de secuencias peptídicas aleatorias presentadas en la superficie de partículas de fago (bibliotecas de fago). Como alternativa, una biblioteca definida de fragmentos peptídicos solapantes puede ensayarse con respecto a unión al anticuerpo de ensayo en ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, puede realizarse

20 mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de exploración de alanina para identificar restos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión de epítipo. Por ejemplo, pueden realizarse experimentos de intercambio de dominio usando un IL-7R mutante en el que diversos fragmentos del polipéptido IL-7R se han

25 reemplazado (intercambiado) con secuencias de IL-7R de otra especie o una

proteína cercanamente relacionada pero antigénicamente distinta (tal como otro miembro de la familia de la proproteína convertasa). Mediante la evaluación de la unión del anticuerpo al IL-7R mutante, la importancia de la unión de fragmento de IL-7R particular a anticuerpo puede evaluarse.

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

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

Puede usarse también el suministro dirigido de composiciones terapéuticas que contienen un vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Las técnicas de suministro de ADN mediado por receptor se describen en, por ejemplo, Findeis y col., Trends Biotechnol., 1993, 11:202;
25 Chiou y col., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene

Transfer, J.A. Wolff, ed., 1994; Wu y col., J. Biol. Chem., 1988, 263:621; Wu y col., J. Biol. Chem., 1994, 269:542; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:3655; Wu y col., J. Biol. Chem., 1991, 266:338. Se administran composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido en un intervalo de

5 aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. Los intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente

10 100 µg de ADN también pueden usarse durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos pueden suministrarse usando vehículos de suministro génico. El vehículo de suministro génico puede ser de origen viral o no viral (véase, generalmente, Jolly, Cancer Gene Therapy, 1994, 1:51; Kimura, Human Gene Therapy, 1994, 5:845; Connelly, Human Gene

15 Therapy, 1995, 1:185; y Kaplitt, Nature Genetics, 1994, 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes puede inducirse usando promotores de mamíferos endógenos o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o regulada.

Los vectores basados en virus para el suministro de un polinucleótido

20 deseado y la expresión en una célula deseada se conocen bien en la técnica. Los vehículos basados en virus ejemplares incluyen, sin limitación, los retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, las Publicaciones de PCT N° WO 90/07936, WO 94/03622, WO 93/25698, WO 93/25234, WO 93/11230, WO 93/10218, WO 91/02805, las Patente de Estados Unidos N° 5.219.740 y

25 4.777.127; Patente de Reino Unido N° 2.200.651 y Patente de EP N° 0 345

- 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores del virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del Río Ross (ATCC VR-373, ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR 1249, ATCC VR-532)) y vectores
- 5 de virus adenoasociados (AAV) (véase, por ejemplo, Publicaciones de PCT N° WO 94/12649, WO 93/03769, WO 93/19191, WO 94/28938, WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse administración de ADN unida a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther., 1992, 3:147.
- 10 También pueden emplearse vehículos y procedimientos de suministro no virales, incluyendo, pero sin limitación, ADN condensado policationico unido o no unido a adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curiel, Hum Gene Ther, 1992, 3:147); ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol Chem, 1989, 264:16985); células vehículos de suministro de células eucariotas
- 15 (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.814.482; Publicaciones de PCT N° WO 95/07994, WO 96/17072, WO 95/30763 y WO 97/42338) y neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Se describen procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares en la Publicación de PCT N° WO 90/11092 y la
- 20 Patente de Estados Unidos N° 5.580.859. Se describen liposomas que pueden actuar como vehículos de suministro génico en la Patente de Estados Unidos N° 5.422.120; las Publicaciones de PCT N° WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445; y el documento EP 0524968. Se describen enfoques adicionales en Philip, Mol. Cell. Biol., 1994, 14:2411, y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci.,
- 25 1994, 91:1581.

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

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

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

cadena ligera parcial de

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYED
DQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCQSYDSSHLVFGGG
TKLTVLC (SEC ID N° 1),

5 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGRIASSYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDN
QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYASSSLWVFGGG
TQLTVLS (SEC ID N° 3),

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYED
DQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCMQYDSSHLVFGGG

10 TKLTVLC (SEC ID N° 5),

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYED
DQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGG
TKLTVLC (SEC ID N° 7),

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYED

15 DQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGG
TKLTVLC (SEC ID N° 9),

NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYED
DQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCMQYDFHHLVFGGG
TKLTVLC (SEC ID N° 11),

20 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDD
QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCMQYDFHHLVFGGGT
KLTVL (SEC ID N° 44), o

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDD
QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTK

25 LTVL (SEC ID N° 41); y (b) un anticuerpo que tiene una secuencia de cadena

pesada parcial de

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHVVRQAPGKGLEWLSLV
GWDGSATYYADSVKGRFTISRDNNTKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYV
FDYWGGGTLVTVSS (SEC ID Nº 2),

5 QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHVVRQAPGKGLEWVSAI
SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNNTKNLLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDISGG
GMDVWGQGTTVTVSS (SEC ID Nº 4),

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHVVRQAPGKGLEWLSLV
GWDGFFTYADSVKGRFTISRDNNTKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDYV

10 FNNWGQGTTLVTVSS (SEC ID Nº 6),

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHVVRQAPGKGLEWLSLV
GWDGFFTYADSVKGRFTISRDNNTKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDY
MGDYWGQGTTLVTVSS (SEC ID Nº 8),

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHVVRQAPGKGLEWLSLV

15 GWDGFFTYADSVKGRFTISRDNNTKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDY
MGNNWGQGTTLVTVSS (SEC ID Nº 10),

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHVVRQAPGKGLEWLSLV
GWDGFFTYADSVKGRFTISRDNNTKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDY
MGNNWGQGTTLVTVSS (SEC ID Nº 12), o

20 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHVVRQAPGKGLEWVSLV
GWDGFFTYADSVKGRFTISRDNNTKNLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDY
MGNNWGQGTTLVTVSS (SEC ID Nº 40).

Tabla 1

mAb	Cadena Ligera	Cadena Pesada
P3A9	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISC <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQRPGN SPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDRFSG SIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC <u>QSYDSSHLV</u> FGGGTKLTVL C (SEC ID N° 1)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS G <u>FTFDD</u> SVMHWVRQAPGKGLEWLSL <u>V</u> <u>GWDGS</u> ATYYADSVKGRFTISRDN T KN LLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>QGDYV</u> <u>FDY</u> WGQGTLLTVSS (SEC ID N° 2)
P4B3	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC <u>TGSSGRIASSYVQ</u> WYQQRPGS APTTVIY <u>EDNQRPS</u> GVPDRFSG SIDSSSNSASLTISGLKTEDEAD YYC <u>QSYASSSLWV</u> FGGGTQLT VLS (SEC ID N° 3)	QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFS</u> NYGMHWVRQAPGKGLEWVS <u>AISGSGGST</u> YYADSVKGRFTISRDN S KNTVYLQMNSLRDEDTAVYYCARD <u>DIS</u> <u>GGGMDV</u> WGQGTTVTVSS (SEC ID N° 4)
P2D2	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISC <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQRPGN SPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDRFSG SIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC <u>MQYDSSHLV</u> FGGGTKLTV LC (SEC ID N° 5)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS G <u>FTFDD</u> SVMHWVRQAPGKGLEWLSL <u>V</u> <u>GWDGFFT</u> YYADSVKGRFTISRDN T KN LLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>QGDYV</u> <u>FNN</u> WGQGTLLTVSS (SEC ID N° 6)

mAb	Cadena Ligera	Cadena Pesada
P2E11	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISC <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQRPGN SPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDRFSG SIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC <u>QSYDFHHLV</u> FGGGTKLTVL C (SEC ID N° 7)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FTFDD</u> SVMHWVRQAPGKGLEWLS <u>LV</u> <u>GWDGFFTY</u> YADSVKGRFTISRDNNTKN LLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>QGDYM</u> <u>GDY</u> WGQGTLLTVSS (SEC ID N° 8)
HAL 403a	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISC <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQRPGN SPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDRFSG SIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC <u>QSYDFHHLV</u> FGGGTKLTVL C (SEC ID N° 9)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FTFDD</u> SVMHWVRQAPGKGLEWLS <u>LV</u> <u>GWDGFFTY</u> YADSVKGRFTISRDNNTKN LLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>QGDYM</u> <u>GNN</u> WGQGTLLTVSS (SEC ID N° 10)
HAL 403b	NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISC <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQRPGN SPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDRFSG SIDSSSNSASLTISGLVTEDEAD YYC <u>MQYDFHHLV</u> FGGGTKLTV LC (SEC ID N° 11)	QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FTFDD</u> SVMHWVRQAPGKGLEWLS <u>LV</u> <u>GWDGFFTY</u> YADSVKGRFTISRDNNTKN LLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>QGDYM</u> <u>GNN</u> WGQGTLLTVSS (SEC ID N° 12)

mAb	Cadena Ligera	Cadena Pesada
C1GM	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQRPGS SPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDRFSG SIDSSSNSASLTISGLKTEDEAD YYC <u>QSYDFHHLV</u> FGGGTKLTVL (SEC ID N° 41)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FTFDD</u> SVMHWVRQAPGKGLEWVSL <u>V</u> <u>GWDGFF</u> TYADSVKGRFTISRDN <u>AKN</u> SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>QGDYM</u> <u>GNN</u> WGQGTLLTVSS (SEC ID N° 40)
C2M3	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISC <u>TRSSGSIDSSYVQ</u> WYQQRPGS SPTTVIY <u>EDDQRPS</u> GVPDRFSG SIDSSSNSASLTISGLKTEDEAD YYC <u>MQYDFHHLV</u> FGGGTKLTV L (SEC ID N° 44)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FTFDD</u> SVMHWVRQAPGKGLEWVSL <u>V</u> <u>GWDGFF</u> TYADSVKGRFTISRDN <u>AKN</u> SLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>QGDYM</u> <u>GNN</u> WGQGTLLTVSS (SEC ID N° 40)

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

- 5 La invención también proporciona partes de CDR de anticuerpos para IL-7R (incluyendo CDR Chothia, Kabat y regiones de contacto de CDR). La determinación de regiones de CDR está dentro de la experiencia de la técnica. Se entiende que en algunas realizaciones, las CDR puede ser una combinación de las CDR de Kabat y Chothia (también denominadas “CR combinadas” o
- 10 “CDR prolongadas”). En algunas realizaciones, las CDR son las CDR de Kabat. En otras realizaciones, las CDR son las CDR de Chothia. En otras palabras, en realizaciones con más de una CDR, las CDR pueden ser cualquiera de CDR de Kabat, de Chothia, de combinación, o combinaciones de las mismas. La Tabla

2 proporciona ejemplos de secuencias de CDR proporcionadas en el presente documento.

Tabla 2

Cadena Pesada			
mAb	CDRH1	CDRH2	CDRH3
P3A9	DSVMH (SEC ID N°: 19)	LVGWDGSATYYADSVKG (SEC ID N° 21)	QGDYVFDY (SEC ID N° 24)
P4B3	NYGMH (SEC ID N° 20)	AISGSGGSTYYADSVKG (SEC ID N° 22)	DISGGGMDV (SEC ID N° 25)
P2D2	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYVFNN (SEC ID N° 26)
P2E11	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYMGDY (SEC ID N° 27)
HAL 403a	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYMGNN (SEC ID N° 28)
C1GM	DSVMH (SEC ID N° 19) (Kabat); GFTFDDS (SEC ID N° 46) (Chothia); GFTFDDSVMH (SEC ID N° 47) (prolongada)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23) (Kabat); GWDGFF (SEC ID N° 48) (Chothia);	QGDYMGNN (SEC ID N° 49);
C2M3	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYMGNN (SEC ID N° 49)
HAL 403b	DSVMH (SEC ID N° 19)	LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N° 23)	QGDYMGNN (SEC ID N° 28)

Consenso de Cadena Pesada	X ₁ X ₂ VMH, en la que X ₁ es D o N; X ₂ es S o Y (SEC ID N° 50)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GX ₆ X ₇ TYYADSV KG, en la que X ₁ es L o A; X ₂ es V o I; X ₃ es G o S; X ₄ es W o G; X ₅ es D o S; X ₆ es F, G o S; X ₇ es F, A o S (SEC ID N° 51)	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ , en la que X ₁ es Q o D; X ₂ es G o I; X ₃ es D o S; X ₄ es Y o G; X ₅ es M, V o G; X ₆ es G o F; X ₇ es N, D o M; X ₈ es N, Y o D (SEC ID N° 52)
Cadena Ligera			
mAb	CDRL1	CDRL2	CDRL3
P3A9	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	QSYDSSHLV (SEC ID N° 33)
P4B3	TGSSGRIASSYVQ (SEC ID N° 30)	EDNQRPS (SEC ID N° 32)	QSYASSSLWV (SEC ID N° 34)
P2D2	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	MQYDSSHLV (SEC ID N° 35)
P2E11	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	QSYDFHHLV (SEC ID N° 36)
HAL 403a	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	QSYDFHHLV (SEC ID N° 36)
C1GM	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	QSYDFHHLV (SEC ID N° 36)
C2M3	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	MQYDFHHLV (SEC ID N° 37)
HAL 403b	TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29)	EDDQRPS (SEC ID N° 31)	MQYDFHHLV (SEC ID N° 37)

Consenso de Cadena Ligera	TX ₁ SSGX ₂ IX ₃ SSYVQ en la que X ₁ es R o G; X ₂ es S o R ; X ₃ es D o A (SEC ID N° 53)	EDX ₁ QRPS en la que X ₁ es D o N (SEC ID N° 54)	X ₁ X ₂ YX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ LX ₇ En la que X ₁ es Q o M; X ₂ es S o Q; X ₃ es D o A; X ₄ es F o S; X ₅ es H o S; X ₆ es H o S; X ₇ es V o W (SEC ID N° 55)
---------------------------------	--	---	---

Las regiones de contacto de CDR son regiones de un anticuerpo que imbuyen especificidad al anticuerpo para un antígeno. En general, las regiones de contacto de CDR incluyen las posiciones de restos en el CDR y zonas de

5 Vernier, que se restringen para mantener una estructura de bucle apropiada para que el anticuerpo se una a un antígeno específico. Véase, por ejemplo, Makabe y col., 2007, "Thermodynamic Consequences of Mutations in Vernier Zone Residues of a Humanized Anti-human Epidermal Growth Factor Receptor Murine Antibody," Journal of Biological Chemistry, 283:1156-1166. La

10 determinación de las regiones de contacto de CDR está dentro de la experiencia de la técnica. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista de IL-7R comprende una o más regiones de contacto de CDR que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en FTFDDSV (SEC ID N° 56), GWDGFF (SEC ID N° 57), ARX₁X₂X₃X₄ en la que

15 X₁, X₂, X₃ y X₄ pueden ser cualquier aminoácido, (SEC ID N° 58), SGSIDSSY (SEC ID N° 59), EDDQRPSGV (SEC ID N° 60) y FHHL (SEC ID N° 61).

La afinidad de unión (K_D) de un anticuerpo antagonista de IL-7R con IL-7R puede ser de aproximadamente 0,002 a aproximadamente 200 nM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente

200 nM, 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pm, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 5 pM o
5 aproximadamente 2 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menor de cualquiera de aproximadamente 250 nM, aproximadamente 200 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pm, aproximadamente 100 pM o aproximadamente 50 pM.

10 La invención también proporciona procedimientos para la preparación de cualquiera de estos anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica o de otro tipo de los anticuerpos, mediante procedimientos recombinantes (es decir, polipéptidos
15 sencillos o de fusión) como se ha descrito anteriormente o mediante síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se preparan convenientemente por síntesis química. Los procedimientos de síntesis química se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, un
20 anticuerpo podría producirse por un sintetizador de polipéptidos automático que emplea el procedimiento de fase sólida. Véase también, las patentes de Estados Unidos N ° 5.807.715; 4.816.567 y 6.331.415.

En otra alternativa, los anticuerpos pueden prepararse de forma recombinante usando procedimientos que son bien conocidos en la técnica. En
25 una realización, un polinucleótido comprende una secuencia que codifica las

regiones variables de cadena pesada y/o de cadena ligera del anticuerpo P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a, HAL403b, C1GM o C2M3. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede expandirse después y congelarse para uso futuro. Los vectores (incluyendo vectores de expresión) y células huésped se describen adicionalmente en el presente documento.

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

polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas de purificación de proteínas convencionales conocidas en la materia.

También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, 5
bienespecíficos en los que los dominios variables de cadena pesada (VH) y variables de cadena ligera (VL) se expresan en una cadena polipeptídica sencilla, pero usando un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra 10
cadena y crear dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., y col, 1993, Proc Natl Acad Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., y col, 1994, Structure 2:1121-1123).

Por ejemplo, anticuerpos bienespecíficos, anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes, 15
pueden prepararse usando los anticuerpos desvelados en el presente documento. Los procedimientos para preparar anticuerpos bienespecíficos se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Suresh y col., 1986, Methods in Enzymology 121: 210). Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos bienespecíficos se basó en la coexpresión de dos pares de cadena 20
ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, teniendo las dos cadenas pesadas diferentes especificidades (Millstein y Cuello, 1983, Nature 305, 537-539).

De acuerdo con un enfoque para preparar anticuerpos bienespecíficos, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de 25
región constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con una

región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN
5 que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que relaciones
10 desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las
15 relaciones no tienen particular relevancia.

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

25 Los anticuerpos heteroconjugados, que comprenden dos anticuerpos

unidos covalentemente, también están dentro del ámbito de la invención. Dichos anticuerpos se han usado para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980), y para tratamiento de infección por VIH (Publicaciones de PCT Nº WO 91/00360 y WO 5 92/200373; documento EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de entrecruzamiento conveniente. Los agentes y técnicas de entrecruzamiento adecuados se conocen bien en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980.

También pueden prepararse anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* 10 usando procedimientos conocidos de química de proteínas sintéticas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

15 Pueden prepararse anticuerpos humanizados usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de aminoácidos predicha y de nucleótidos de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida, (2) diseñar el 20 anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región flanqueante de anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización, (3) las propias metodologías/técnicas de humanización y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 25 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

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

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

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxi terminales que varían en longitud de un resto a polipéptidos que contiene cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos aminoacídicos sencillos o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales
25 incluyen un anticuerpo con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo

fusionado con un marcador de epítipo. Otras variantes de inserción de la molécula anticuerpo incluyen la fusión con el extremo C-terminal o N-terminal del anticuerpo de una enzima o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en la circulación sanguínea.

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

15 Tabla 3: Sustituciones de Aminoácidos

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

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

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

(1) No-polares: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

- (2) Polares sin carga: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) Ácidos (cargados negativamente): Asp, Glu;
- (4) Básicos (cargados positivamente): Lys, Arg;
- (5) Restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro; y
- 5 (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe, His.

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

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

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

Las modificaciones también incluyen polipéptidos glucosilados y no glucosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales, tales como, por ejemplo, glucosilación con diferentes
 25 azúcares, acetilación y fosforilación. Los anticuerpos se glucosilan en

posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, 1997, Chem. Immunol. 65: 111-128; Wright y Morrison, 1997, TibTECH 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacáridos de las inmunoglobulinas afectan a la función de la proteína (Boyd y col., 1996, Mol. Immunol. 32: 1311-1318; Wittwe
5 y Howard, 1990, Biochem. 29: 4175-4180) y la interacción intramolecular entre partes de la glucoproteína, que pueden afectar a la conformación y superficie tridimensional presentada de la glucoproteína (Jefferis y Lund, mencionado anteriormente; Wyss y Wagner, 1996, Current Opin. Biotech. 7: 409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glucoproteína dada a
10 ciertas moléculas basándose en estructuras de reconocimiento específicas. También se ha indicado que la glucosilación de anticuerpos afecta a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En particular, las células CHO con expresión regulada por tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la
15 formación de GlcNAc de bisección, se ha indicado que han mejorado la actividad de ADCC (Umana y col., 1999, Mature Biotech. 17:176-180).

La glucosilación de anticuerpos típicamente está enlazada en N o enlazada en O. Enlazada en N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas
20 asparagina-X-serina, asparagina-X-treonina y asparagina-X-cisteína, siendo X cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La
25 glucosilación enlazada en O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-

acetilgalactosamina, galactosa o xilosa con un ácido hidroxiamínico, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

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

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

Además de la selección de células huésped, los factores que pueden
20 afectar a la glucosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de los medios, densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos procedimientos para alterar el patrón de glucosilación conseguido en un organismo huésped particular incluyendo la introducción o sobreexpresión
25 de ciertas enzimas implicadas en producción de oligosacáridos (Patentes de

Estados Unidos N° 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glucosilación, o ciertos tipos de glucosilación, puede eliminarse enzimáticamente de la glucoproteína, por ejemplo, usando endoglucosidasa H (Endo H), N-glucosidasa F, endoglucosidasa F1, endoglucosidasa F2, endoglucosidasa F3.

- 5 Además, la célula huésped recombinante puede modificarse por ingeniería genética para ser deficiente en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Esta y otras técnicas similares se conocen bien en la materia.

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

- 15 En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que tiene afinidad aumentada para un receptor Fc gamma humano, es inmunológicamente inerte o parcialmente inerte, por ejemplo, no desencadena lisis mediada por complemento, no estimula citotoxicidad mediada por células dependiente de
20 anticuerpo (ADCC) o no activa microglía; o tiene actividades reducidas (en comparación con el anticuerpo no modificado) en una cualquiera o más de las siguientes: desencadenar la lisis mediada por complemento, estimular la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o activar microglía. Diferentes modificaciones de la región constante pueden usarse para
25 conseguir un nivel y/o combinación óptimos de las funciones efectoras. Véase,

por ejemplo, Morgan y col., *Immunology* 86: 319-324, 1995; Lund y col., *J. Immunology* 157: 4963-9 157:4963-4969, 1996; Idusogie y col., *J. Immunology* 164:4178-4184, 2000; Tao y col., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; y Jefferis y col., *Immunological Reviews* 163: 59-76, 1998. En algunas

5 realizaciones, la región constante se modifica como se describe en *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29: 2613-2624; Solicitud de PCT N° PCT/GB99/01441; y/o Solicitud de Patente de Reino Unido N° 9809951.8. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de IgG2 de cadena pesada humana que comprende las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331

10 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2 de tipo silvestre). *Eur. J. Immunol.*, 1999, 29: 2613-2624. En otras realizaciones más, la región constante está aglucosilada para glucosilación enlazada en N. En algunas realizaciones, la región constante está aglucosilada para glucosilación enlazada en N mediante la mutación del resto aminoacídico glucosilado o

15 restos flanqueantes que son parte de la secuencia de reconocimiento de N-glucosilación en la región constante. Por ejemplo, el sitio de N-glucosilación N297 puede mutarse a A, Q, K o H. Véase, Tao y col., *J. Immunology* 143: 2595-2601, 1989; y Jefferis y col., *Immunological Reviews* 163: 59-76, 1998. En algunas realizaciones, la región constante se aglucosila para glucosilación

20 enlazada en N. La región constante puede estar glucosilada para glucosilación enlazada en N enzimáticamente (tal como retirando carbohidratos por la enzima PNGasa) o mediante expresión en una célula huésped deficiente en glucosilación.

Otras modificaciones de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han

25 modificado como se describe en la Publicación de PCT N° WO 99/58572. Estos

anticuerpos comprenden, además de un dominio de unión dirigido a la molécula diana, un dominio efector que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a toda o parte de una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Estos anticuerpos son capaces

5 de unirse a la molécula diana sin desencadenar una lisis dependiente de complemento significativa o destrucción mediada por células de la diana. En algunas realizaciones, el dominio efector es capaz de unirse específicamente a FcRn y/o FcγRIIb. Esto se basa típicamente en dominios quiméricos derivados de dos o más dominios C_H2 de cadena pesada de inmunoglobulina humana.

10 Los anticuerpos modificados de esta manera son particularmente adecuados para su uso en terapia de anticuerpos crónica, para evitar reacciones inflamatorias o adversas de otro tipo ante terapia de anticuerpos convencional.

La invención incluye realizaciones de maduración de afinidad. Por ejemplo, los anticuerpos con afinidad madurada pueden producirse mediante

15 procedimientos conocidos en la técnica (Marks y col., 1992, Bio/Technology, 10: 779-783; Barbas y col., 1994, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91: 3809-3813; Schier y col., 1995, Gene, 169: 147-155; Yelton y col., 1995, J. Immunol., 155: 1994-2004; Jackson y col., 1995, J. Immunol., 154(7): 3310-9; Hawkins y col., 1992, J. Mol. Biol., 226: 889-896; y Publicación de PCT N° WO2004/058184).

20 Los siguientes procedimientos pueden usarse para ajustar la afinidad de un anticuerpo y para caracterizar una CDR. Una forma de caracterizar una CDR de un anticuerpo y/o alterar (tal como mejorar) la afinidad de un polipéptido, tal como un anticuerpo, se denomina “mutagénesis de exploración de biblioteca”. Generalmente, la mutagénesis de exploración de biblioteca

25 funciona como sigue. Una o más posiciones de aminoácidos en la CDR se

reemplazan con dos o más (tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20) aminoácidos usando procedimientos reconocidos en la técnica. Esto genera pequeñas bibliotecas de clones (en algunas realizaciones, una por cada posición de aminoácidos que se analiza), cada una con una

5 complejidad de dos o más miembros (si se sustituyen dos o más aminoácidos en cada posición). Generalmente, la biblioteca también incluye un clon que comprende el aminoácido nativo (no sustituido). Un pequeño número de clones, por ejemplo, aproximadamente 20-80 clones (dependiendo de la complejidad de la biblioteca), de cada biblioteca se exploran con respecto a

10 afinidad de unión con el polipéptido diana (u otra diana de unión) y se identifican candidatos con unión mejorada, la misma, disminuida o ninguna. Los procedimientos para determinar afinidad de unión se conocen bien en la técnica. La afinidad de unión puede determinarse usando análisis de resonancia de plasmón superficial Biacore™, que detecta diferencias en la

15 afinidad de unión de aproximadamente dos veces o más. Biacore™ es particularmente útil cuando el anticuerpo de partida ya se une con una afinidad relativamente alta, por ejemplo una K_D de aproximadamente 10 nM o menos. La exploración usando resonancia de plasmón superficial de Biacore™ se describe en los Ejemplos, en el presente documento.

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

25 En algunas realizaciones, cada posición de aminoácidos en una CDR

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

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

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

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

Pueden realizarse múltiples rondas de exploración. Por ejemplo, los
25 candidatos (comprendiendo cada uno una sustitución de aminoácidos en una o

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

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

Los candidatos con afinidad mejorada pueden combinarse en una segunda biblioteca que incluye el aminoácido mejorado, el aminoácido original en esa posición y pueden incluir adicionalmente sustituciones adicionales en
25 esa posición, dependiendo de la complejidad de la biblioteca que se desee o se

permite usando el procedimiento de exploración o selección deseado. Además, si se desea, puede seleccionarse aleatoriamente posiciones de aminoácidos adyacentes hasta al menos 2 o más aminoácidos. La selección aleatoria de aminoácidos adyacentes puede permitir flexibilidad conformacional adicional en la CDR mutante, que puede a su vez permitir o facilitar la introducción de un mayor número de mutaciones de mejora. La biblioteca puede comprender también sustituciones en posiciones que no mostraron afinidad mejorada en la primera ronda de exploración.

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

La invención también abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más fragmentos o regiones de los anticuerpos de la presente invención. En una realización, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la región de cadena ligera variable mostrada en las SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 41 ó 44 y/o al menos 10 aminoácidos de la región de cadena pesada variable mostrada en la SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 40. En otras realizaciones, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25 o al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos

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

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

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos conjugados (por ejemplo, unidos) con un agente que

- facilitan el acoplamiento a un soporte sólido (tal como biotina o avidina). Para simplificar, se hará referencia generalmente a anticuerpos entendiendo que estos procedimientos se aplican a cualquiera de las realizaciones de unión a IL-7R y/o de antagonista descritas en el presente documento. La conjugación
- 5 generalmente se refiere a la unión de estos componentes como se describe en el presente documento. La unión (que es generalmente disponer estos componentes en asociación cercana al menos para administración) puede conseguirse de cualquier variedad de maneras. Por ejemplo, una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un
- 10 sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como anhídrido o un haluro ácido o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo un haluro) en el otro.
- 15 Un anticuerpo o polipéptido de la presente invención puede unirse a un agente marcador tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Se conocen en la técnica marcadores que generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal.
- 20 La invención también proporciona composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) y kits que comprenden, como deja claro la presente divulgación, cualquiera o todos los anticuerpos y/o polipéptidos descritos en el presente documento.
- La invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican
- 25 los anticuerpos de la invención y vectores y células huésped que comprenden

el polinucleótido.

En consecuencia, la invención proporciona polinucleótidos (o composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden polinucleótidos que codifican cualquiera de los siguientes: los anticuerpos

5 C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a y HAL403b o cualquier fragmento o parte de los mismos que tiene la capacidad de antagonizar IL-7R.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) y polipéptidos descritos en el presente documento, tales como anticuerpos y

10 polipéptidos que tienen función efectora alterada. Los polinucleótidos pueden prepararse y expresarse por procedimientos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la invención. En algunas realizaciones, la composición

15 comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo como se describe en el presente documento. En otra realización, la composición comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En otras realizaciones más, la composición comprende

20 ambos o uno de los polinucleótidos mostrados en SEC ID N°: 38 y SEC ID N°: 39 a continuación:

Región variable de cadena pesada C1GM

GAGGTCCAGTTAGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCGGGGGGGT
 CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTCTGTCA
 25 TGCACTGGGTCCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTTTCTCTT

GTTGGTTGGGATGGTTTTTTTACATACTATGCAGACTCAGTGAAGGGCCGA
 TTCACCATCTCCAGAGACAACGCGAAGAACTCTCTGTATCTGCAAATGAAC
 AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAGGGG
 ATTACATGGGGAACAACCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

5 (SEC ID N°: 38)

Región variable de cadena ligera C2GM

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAATCTCCGGGAAAGACG
 GTGACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGACAGTTCCTATGT
 GCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGCTCCCCACCACTGTGATCTAT
 10 GAGGATGACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCAT
 CGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGAAAAGTGA
 GGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGTCTTATGATTTTCATCATCTGGTGTT
 CGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (SEC ID N°: 39).

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

Región variable de cadena pesada HAL403a

CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCGGGGGGGT
 CCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTCTGTCA
 20 TGCAGTGGGTCCGTCAAGCTCCGGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTCTCTCTT
 GTTGGTTGGGATGGTTTTTTTACATACTATGCAGACTCAGTGAAGGGCCGA
 TTCACCATCTCCAGAGACAACACCAAGAACTTACTGTATCTGCAAATGAAC
 AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAGGGG
 ATTACATGGGGAACAACCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

25 (SEC ID N°: 14)

Región variable de cadena ligera HAL403a

AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGGGTCTCCGGGAAAGAC
 GGTGACCATCTCCTGCACCCGCAGCAGTGGCAGCATTGACAGTTCCTATG
 TGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAATTCCCCCACCCTGTGATCTAT
 5 GAGGATGACCAAAGACCCTCTGGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCAT
 CGACAGCTCCTCCAACTCTGCCTCCCTCACCATCTCTGGACTGGTGACTG
 AGGACGAGGCTGACTACTACTGTCAGTCTTATGATTTTCATCATCTGGTGT
 TCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTATGT (SEC ID N°: 15).

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

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para
 preparar cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento.

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

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir,
 una secuencia endógena que codifica un anticuerpo o una parte del mismo) o
 25 pueden comprender una variante de una secuencia tal. Las variantes de

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

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

Un alineamiento óptimo de las secuencias para su comparación puede
25 realizarse usando el programa Megalign en la recopilación de software de

- bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI), usando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineamiento descritos en las siguientes referencias: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In
- 5 Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Supl. 3, pág. 345-358; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenies pág. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. y Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. y Muller
 - 10 W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. y Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.
 - 15 Preferentemente, el “porcentaje de identidad de secuencia” se determina por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones, en la que la parte de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20% o menos,
 - 20 habitualmente del 5 al 15 por ciento o del 10 al 12 por ciento en comparación con las secuencias de referencia (que no comprenden adiciones o deleciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula mediante la determinación del número de posiciones en las que las bases de ácido nucleico o restos aminoacídicos idénticos aparecen en ambas
 - 25 secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el

número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la secuencia de referencia (es decir el tamaño de ventana) y multiplicando los resultados por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

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

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

Como se usa en el presente documento, “condiciones altamente
 15 rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad” son las que: (1) emplean fuerza iónica baja y temperatura alta para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al
 20 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0.075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al
 25 10% a 42°C, con lavados a 42°C en SSC 0,2 x (cloruro sódico/citrato sódico) y

formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55°C. El experto en la materia reconocerá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de sonda y similares.

- 5 Se apreciará por los expertos en la materia que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido como se describe en el presente documento. Algunos de estos polinucleótidos portan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, los
- 10 polinucleótidos que varían debido a diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente por la presente invención. Además, los alelos de los genes que comprenden las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en el presente documento están dentro del ámbito de la presente invención. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más
- 15 mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos. Los ARNm y proteínas resultantes pueden, pero no necesitan, tener una estructura o función alteradas. Los alelos pueden identificarse usando técnicas convencionales (tales como hibridación, amplificación y/o comparación de secuencias en bases de datos).
- 20 Los polinucleótidos de la presente invención pueden obtenerse usando síntesis química, procedimientos recombinantes o PCR. Los procedimientos de síntesis de polinucleótidos química se conocen bien en la técnica y no necesitan describirse en detalle en el presente documento. Un experto en la materia puede usar las secuencias proporcionadas en el presente documento y
- 25 un sintetizador de ADN comercial para producir una secuencia de ADN

deseada.

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

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

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

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

15 Los vectores de expresión generalmente son construcciones de polinucleótidos replicables que contienen un polinucleótido de acuerdo con la invención. Se implica que un vector de expresión debe ser replicable en las células huésped como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico. Los vectores de expresión adecuados incluyen sin limitación
20 plásmidos, vectores virales, incluyendo adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, cósmidos y un vector o vectores de expresión desvelados en la Publicación de PCT N° WO 87/04462. Los componentes de vector pueden incluir generalmente, sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal; un origen de replicación; uno o más genes marcadores; elementos de
25 control transcripcional adecuados (tales como promotores, potenciadores y

terminador). Para la expresión (es decir, traducción), uno o más elementos de control traduccional también se requieren habitualmente, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de iniciación de la traducción y codones de terminación.

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

La invención también proporciona células huésped que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento. Cualquier

15 célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos puede usarse con el fin de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitantes de células huésped de mamífero incluyen sin limitación células COS, HeLa y CHO. Véase también la Publicación de PCT N° WO 87/04462. Las células huésped no de mamífero adecuadas incluyen

20 procariotas (tales como *E. coli* o *B. subtilis*) y levadura (tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; o *K. lactis*). Preferentemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel aproximadamente 5 veces mayor, más preferentemente, 10 veces mayor, incluso más preferentemente, 20 veces mayor que el del anticuerpo o proteína endógena correspondiente de interés, si

25 está presente, en las células huésped. La exploración de las células huésped

con respecto a una unión específica a IL-7R o un dominio de IL-7R se efectúa por un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobreexpresa el anticuerpo o proteína de interés.

Composiciones

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

Se entiende que las composiciones pueden comprender más de un

25 anticuerpo antagonista de IL-7R (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos

antagonistas de IL-7R que reconocen diferentes epítomos de IL-7R). Otras composiciones ejemplares comprenden más de un anticuerpo antagonista de IL-7R que reconocen el mismo epítomo o los mismos epítomos o diferentes especies de anticuerpos antagonistas de IL-7R que se unen a diferentes
5 epítomos de IL-7R.

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

tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilen glicol (PEG). Se describen adicionalmente en el presente documento excipientes farmacéuticamente aceptables.

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

D. Kits

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

En algunas realizaciones, el antagonista de IL-7R es un anticuerpo antagonista de IL-7R. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Las
20 instrucciones relacionadas con el uso de un anticuerpo antagonista de IL-7R generalmente incluyen información con respecto a dosificación, programa de dosificación y vía de administración para el tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, envases a granel (por ejemplo, envases multi dosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones proporcionadas en los kits
25 de la invención son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o

prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones leíbles por máquina (por ejemplo, instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

Los kits de la presente invención están en un envase adecuado. Los
5 envases adecuados incluyen, sin limitación, viales, botellas, tarros, envasados flexibles (por ejemplo, bolsas de Mylar o plástico selladas) y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba.
10 Un kit puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón atravesable por una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón atravesable por una aguja de
15 inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo antagonista de IL-7R. El recipiente puede comprender adicionalmente un segundo agente farmacéuticamente activo.

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

Mutaciones y Modificaciones

Para expresar los anticuerpos de IL-7R de la presente invención, pueden obtenerse primero fragmentos de ADN que codifican las regiones VH y
25 VL usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. También

pueden introducirse diversas modificaciones, por ejemplo, mutaciones, deleciones y/o adiciones a las secuencias de ADN usando procedimientos convencionales conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, puede llevarse a cabo mutagénesis usando procedimientos convencionales, tales como mutagénesis mediada por PCR, en la que los nucleótidos mutados se incorporan a los cebadores de PCR de modo que el producto de PCR contiene las mutaciones deseadas o mutagénesis dirigida.

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

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

También puede realizarse una modificación o mutación en una región flanqueante o región constante para aumentar la semivida de un anticuerpo de IL-7R. Véase, por ejemplo, Publicación de PCT N° WO 00/09560. También puede realizarse una mutación en una región flanqueante o región constante

para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, para proporcionar un sitio para unión covalente o no covalente con otra molécula o para alterar tales propiedades como fijación de complemento, unión de FCR y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo. De acuerdo con la invención,

5 un anticuerpo único puede tener mutaciones en una o más de las CDR o regiones flanqueantes del dominio variable o en la región constante.

En un procedimiento conocido como “adaptación a línea germinal”, ciertos aminoácidos en las secuencias VH y VL pueden mutarse para coincidir con los hallados de forma natural en las secuencias VH y VL de línea germinal.

10 En particular, las secuencias de aminoácidos de las regiones flanqueantes en las secuencias VH y VL pueden mutarse para coincidir con las secuencias de línea germinal para reducir el riesgo de inmunogenicidad cuando el anticuerpo se administra. Las secuencias de ADN de línea germinal para genes VH y VL humanos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la base de datos de

15 secuencias de línea germinal humana “Vbase”; Véase también Kabat, EA, y col, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N°. 91-3242; Tomlinson y col, 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox y col, 1994, Eur. J. Immunol. 24:827-836.

20 Otro tipo de sustitución de aminoácidos que puede realizarse es retirar sitios proteolíticos potenciales en el anticuerpo. Tales sitios pueden aparecer en una región CDR o flanqueante de un dominio variable o en la región constante de un anticuerpo. La sustitución de restos de cisteína y retirada de sitios proteolíticos puede disminuir el riesgo de heterogeneidad en el producto

25 de anticuerpo y aumentar de este modo su homogeneidad. Otro tipo de

sustitución de aminoácido es eliminar los pares asparagina-glicina, que forman sitios de desamidación potencial, alterando uno o ambos restos. En otro ejemplo, la lisina C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo de IL-7R de la invención puede escindirse. En diversas realizaciones de la invención, las
5 cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de IL-7R pueden incluir opcionalmente una secuencia señal.

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

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen
20 de cadena pesada de longitud completa mediante la unión operativa del ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humanos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., y col, 1991, Sequences of Proteins of Immunological
25 Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services,

Publicación de NIH N° 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferentemente es una región
5 constante IgG1 o IgG2. La secuencia de región constante de IgG puede ser cualquiera de los diversos alelos o alotipos que se sabe que aparecen entre diferentes individuos, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3) y Gm(17). Estos alotipos representan sustituciones de aminoácidos de origen natural en las regiones constantes de IgG1. Para un gen de cadena pesada de fragmento
10 Fab, el ADN que codifica V_H puede estar unido operativamente con otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada. La región constante de cadena pesada CH1 puede derivarse de cualquiera de los genes de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen
15 de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) mediante la unión operativa de ADN que codifica VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, EA, y col, 1991, Sequences of Proteins of
20 Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242) y se pueden obtener fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. La región constante kappa puede ser cualquiera de
25 los diversos alelos que se sabe que aparecen entre diferentes individuos, tales

como Inv(1), Inv(2) e Inv(3). La región constante lambda puede derivar de cualquiera de los tres genes lambda.

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

En otra realización, puede prepararse un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que comprende todo o una parte de un anticuerpo de IL-7R de la invención unido a otro polipéptido. En otra realización, solamente los dominios variables del anticuerpo de IL-7R se unen al polipéptido. En otra realización, el dominio VH de un anticuerpo de IL-7R se une a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL de un anticuerpo de IL-7R se une a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de modo que los dominios de VH y VL pueden interactuar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno. En otra realización preferida, el dominio VH se separa del dominio VL por un engarce de modo que los dominios VH y VL pueden interactuar entre sí. El anticuerpo de VH-engarce-VL se une después al

polipéptido de interés. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos de cadena sencilla se unen entre sí. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una cadena polipeptídica sencilla o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

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

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

Generación de anticuerpos específicos de antígeno

25 Se evaluaron anticuerpos monoclonales inducidos contra quimera IL-

7R α /CD127/Fc de ratón recombinante (R y D Systems N° de Cat. 747-MR) y anticuerpos humanos obtenidos mediante bioselección de una biblioteca de anticuerpos vírgenes humanos con IL-7R α recombinante con respecto a su capacidad para unirse a IL-7R humano y de ratón. Los anticuerpos se exploraron adicionalmente con respecto a su capacidad para bloquear la fosforilación de STAT5 mediada por IL-7 en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y/o PBMC de mono. Este modo de preparación de anticuerpos produjo anticuerpos antagonistas que muestran bloqueo de fosforilación de STAT5 mediado por IL-7, como se muestra en el Ejemplo 1.

Los materiales representativos de la presente invención se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) el ___ de enero de 2011. El vector C1GM-VH que tiene N° de acceso de ATCC ___ es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada C1GM y el vector C1GM-VL que tiene el N° de acceso de ATCC ___ es un polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera C1GM. Los depósitos se realizaron bajo las disposiciones del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del procedimiento en materia de Patentes y las regulaciones según la presente (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha de depósito. El depósito se pondrá a disponibilidad de acuerdo con ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest y sujeto a un acuerdo entre Pfizer, Inc. y ATCC, que asegura una disponibilidad permanente y sin restricciones de la descendencia del cultivo del depósito al público tras emisión de la Patente de Estados Unidos pertinente o tras la apertura al público de cualquier solicitud de Patente de Estados Unidos o extranjera, la que suceda

primero, y asegura la disponibilidad de la descendencia a alguien determinado por el Comisario de Patentes y Marcas Comerciales de Estados Unidos que tiene derecho a ello de acuerdo con 35 U.S.C. Sección 122 y las normas del Comisario conforme a ello (incluyendo 37 C.F.R. Sección 1.14 con referencia particular a 886 OG 638).

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

Los siguientes ejemplos se ofrecen con propósitos solamente ilustrativos y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención de ningún modo. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y quedan dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

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

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

Procedimientos generales para inmunización de animales para generar anticuerpos monoclonales:

25 Se inmunizó una rata hembra Sprague Dawley de 2 meses con 50 ug

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

Exploración por ELISA de anticuerpos:

Se exploraron los medios sobrenadantes de clones de hibridoma crecientes se forma separada con respecto a su capacidad para unirse al IL-7R de ratón recombinante (rr). Los ensayos se realizaron con placas de 96 pocillos
25 revestidas durante una noche con 50 ul de una solución 1 μ g/ml del antígeno.

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

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

Se aislaron anticuerpos humanos anti-IL-7 α humano de una biblioteca de anticuerpos scFv vírgenes humanos de presentación de fagos (Glanville G. y col, 2009, Proc Natl Acad Sci USA, 106(48):20216-20221) por una serie de cuatro ciclos de bio-selección frente a IL-7R α humano (R&D Systems®). Para

- cada ciclo de selección, se revistió un inmunotubo con 1 ml de IL-7R α (10 ug/ml en PBS) a 4°C durante una noche. El inmunotubo revestido con IL-7R α se lavó tres veces con PBST. Se añadieron 10¹³ fagos (1 ml) al inmunotubo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir la unión.
- 5 Después de la unión, el inmunotubo se lavó ocho veces con PBST. Se eluyó el fago unido y se usó para infectar células TG1 de nuevo cultivo. Después del cuarto ciclo de selección, se exploraron los positivos para unión frente a IL-7R α humano e IL-7R de ratón mediante ELISA. Los anticuerpos que se unían a IL-7R humano y de ratón se estudiaron adicionalmente con respecto a sus
- 10 afinidades y función de bloqueo y se seleccionaron anticuerpos para maduración de afinidad.

Ensayo funcional in vitro:

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

- Para la exploración funcional, se preincubaron PBMC humanas durante
- 25 5 minutos con anticuerpos de ensayo (10 μ g/ml) antes de la adición de IL-7. Se

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

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

Como se midió mediante tinción de p-STAT5, los anticuerpos humanos P2D2, P2E11, HAL403a, C1GM, C1GM-2 y C2M3 bloquean la señalización

mediada por IL-7 humana en una manera dependiente de dosis (Figura 1 y datos no mostrados). El control de isotipo se estableció como 100% de tinción de p-STAT5. A 10 µg/ml el anticuerpo HAL403a bloqueó la fosforilación de STAT5 de forma muy eficaz (Figura 1). C1GM, C1GM-2 y C2M3 bloquearon la fosforilación de STAT5 de forma comparable a HAL403a (datos no mostrados).

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

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWVSLV
 GWDGFFTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDY
 10 MGNNWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
 NTKVDKKVAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
 ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 15 WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK (SECID N° 42)

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

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDD
 20 QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTK
 LTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
 AGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECS (SEC ID N° 43)

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

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWVSLV
 GWDGFFTYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDY
 MGNWVGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKP
 5 SNTKVDKTVAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK
 GLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
 WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK (SECID N° 45)

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

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDD
 QRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGGTK
 LTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
 15 AGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
 TECS (SEC ID N° 43)

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

QVNLRESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFDDSVMHWRQAPGKGLEWLSLV
 20 GWDGFFTYADSVKGRFTISRDNKNTKLLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQGDY
 MGNWVGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
 TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKP
 SNTKVDKTVAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK
 25 GLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SECID N° 17)

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

5 NFMLTQPHSVSGSPGKTVTISCTRSSGSIDSSYVQWYQQRPGNSPTTVIYED
DQRPSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLVTEDEADYYCQSYDFHHLVFGGG
TKLTVLTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEC ID N° 18)

10 Ejemplo 2: Determinación de la Afinidad de Unión del Anticuerpo

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

Las afinidades de los anticuerpos antagonistas de IL-7R para IL-7R humano se midieron en un biosensor de resonancia de plasmón superficial

15 Biacore™ 2000 o 3000 equipado con una microplaca sensora CM5 de uso en investigación (Biacore™AB, Uppsala, Suecia - ahora GE Healthcare). Se acoplaron con amina fragmentos de F(ab')₂ anti-humanos de cabra policlonales (específicos de Fc) a niveles de saturación en las cuatro celdas de flujo usando una química convencional de N-hidroxisuccinimida/etildimetilaminopropil

20 carbodiimida (NHS/EDC), en tampón de ejecución de HBS-P (de Biacore™). El tampón se cambió a HBS-P que contenía BSA 1 mg/ml. Se diluyó antígeno de IL-7R-hFc humano [R&D systems, Minneapolis, USA] hasta aproximadamente 30 µg/ml y se capturó durante 3 minutos a 5 µl/minuto para proporcionar niveles de aproximadamente 500-1000 UR por celda de flujo, dejando uno en

25 blanco para servir como canal de referencia. Se inyectaron los formatos Fab,

hlgG1 o hlgG2ΔA de los anticuerpos por duplicado como una serie de 5 miembros 3 veces comenzando a 2 μM y una serie de 5 miembros 4 veces comenzando a 0,4 μM durante 3 minutos a 20-50 μl/minuto. Se controló la disociación durante 5 minutos. La microplaca de captura se regeneró después de la última inyección de cada valoración con dos pulsos de 30 segundos de ácido fosfórico 75 mM o glicina-HCl 10 mM pH 1,7. Los ciclos de tampón proporcionaron blancos para la doble referencia de los datos de respuesta de unión, que se ajustaron después globalmente a un modelo de unión reversible simple usando software Biaevaluation v.4.1 para deducir las constantes de velocidad de asociación y disociación cinéticas, respectivamente k_a y k_d . Las afinidades se dedujeron de su relación ($K_D = k_d/k_a$). Los resultados de la Tabla 4 muestran que estos anticuerpos tienen afinidades picomolares o nanomolares para IL-7R humano.

Tabla 4

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

C2M3**	1,41E+06	3,07E-04	0,218
C2M3***	1,55E+06	3,02E-04	0,195

* Fab; ** hlgG1; * hlgG2ΔA

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

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

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

15 Se inyectó a ratones hembra NOD de 6-8 semanas de edad (The Jackson Laboratory) por vía intraperitoneal (i.p.) semanalmente comenzando a las 9 semanas de edad (t = 0) 3 ó 10 mg/kg de peso corporal de 28G9. Se usaron PBS o anticuerpo monoclonal de rata de isotipo coincidente no reactivo (isotipo) como controles negativos. El anticuerpo de isotipo se administró a
20 mg/kg de peso corporal. Se controlaron los ratones dos veces por semana con respecto a peso corporal y glucosa en sangre. La diabetes se consideró establecida cuando el nivel de glucosa en sangre estaba en o por encima de

lecturas positivas, es decir, por encima de 250 mg/dl para dos controles consecutivos. La aparición de la diabetes se fechó a partir de la primera de las mediciones secuenciales.

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

Para investigar el efecto de los anticuerpos antagonistas de IL-7R en regulación de linfocitos T periféricos, se inmunotñeron linfocitos T CD4+ y CD8+ para los marcadores de activación CD44 y CD62L y se analizaron mediante citometría de flujo. Se aislaron linfocitos T CD4+ y CD8+ de la sangre

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

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

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

El ensayo de activación de STAT5 se usó para identificar anticuerpos antagonistas de IL-7R. Se homogeneizaron bazo de B6 o BALB/c en PBS y se lisaron en tampón de lisis ACK (Invitrogen) durante 2 minutos y después se filtraron a través de una malla de tamaño de poro de 100 μ m, se sedimentaron y se resuspendieron a 5×10^6 células/ml a temperatura ambiente en RPMI 1640 a 37°C que contenía FBS al 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml) y L-glutamina. Se mantuvieron las células a 37°C en CO₂ al 5% en tubos cónicos (para evitar adherencia de monocitos/macrófagos) durante 1-2 horas antes de la estimulación. Las células se preincubaron con anticuerpo de

ensayo durante 5 minutos antes de la estimulación con IL-7. Las células se trataron durante 15 minutos con IL-7 murina (mIL-7, 0,1 ng/ml). Se añadió formaldehído directamente al medio de cultivo hasta una concentración final del 1,6% y se fijaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se
5 añadió después metanol directamente hasta una concentración final del 80% y se almacenaron las muestras a 4°C durante 30 minutos a 1 hora antes de la inmunotinción. Los siguientes anticuerpos se usaron para inmunotinción: CD11b-FITC (M1/70), B220 Cy5.5PerCP, TCR β -FITC, p-STAT5 (Y694, clon 47)-Alexa 647 (BD™Pharmingen). Se tiñeron células TCR β + y CD11b+ para
10 fosfo-STAT5. Se observó la fosforilación de STAT5 estimulada con IL-7 mediante selección con TCR β en citometría de flujo. Se identificaron varios anticuerpos que bloqueaban la fosforilación de STAT5, incluyendo los anticuerpos monoclonales 28B6 y 28G9.

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

(Figura 6). Este resultado demuestra que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces en la ralentización de la progresión de EAE.

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

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

eficaces para mejorar EAE establecida continua.

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

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

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

Para obtener una mejor comprensión de los mecanismos mediante los que actúa el anticuerpo antagonista de IL-7R para mejorar EAE en el modelo de ratón, se analizaron las poblaciones de linfocitos de animales tratados y control mediante inmunotinción y citometría de flujo. Para los estudios inmunológicos en este ejemplo, se trataron animales con EAE inmunizados con MOG semanalmente con anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9 (10 mg/kg), 28B6 (10 mg/kg) o vehículo (anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo, 10 mg/kg). En estudios seleccionados, se trató a un grupo de animales con EAE inmunizados con MOG semanalmente con 28B6 (10 mg/kg). Se sacrificaron los animales el día 21 después de la inmunización y se recogieron los órganos

linfoides centrales. Se prepararon los linfocitos de los órganos y se tiñeron como se describe posteriormente. Los linfocitos inmunoteñidos se analizaron mediante citometría de flujo.

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

15 Debido a que la señalización de IL-7R es crítica para la supervivencia de linfocitos T vírgenes y para la proliferación de linfocitos T de memoria, el efecto de los anticuerpos antagonistas de IL-7R en la regulación de linfocitos T periféricos se analizó mediante inmunotinción usando los marcadores de activación CD44 y CD62L. $CD44^{lo}CD62L^{hi}$ representa linfocitos T vírgenes,
 20 $CD44^{hi}CD62L^{lo}$ representa linfocitos T activados y $CD44^{hi}CD62L^{hi}$ representa linfocitos T de memoria. En comparación con animales tratados con vehículo (anticuerpo de isotipo coincidente no reactivo), los ratones tratados con anticuerpo antagonista de IL-7R tuvieron poblaciones de linfocitos T vírgenes y linfocitos T activados significativamente agotadas (Figuras 12A y 12C). Sin
 25 embargo, las poblaciones de linfocitos T de memoria no se agotaron

significativamente (Figura 12B). Este agotamiento selectivo de poblaciones de linfocitos T vírgenes y activados puede proporcionar beneficios en tanto que el agotamiento de linfocitos T vírgenes puede bloquear la activación de linfocitos T específicos de autoAg nacientes, previniendo a su vez EAE. Los linfocitos T de memoria no se agotan y de este modo, la inmunidad anti-infección se conserva.

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

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

observado con terapia con anticuerpo de IL-2R α .

Preparación de linfocitos y tinción de inmunofluorescencia

Para los estudios anteriores, se generaron suspensiones de leucocitos de célula sencilla de bazo, ganglios linfáticos periféricos (axilares, bronquiales e inguinales emparejados), timo y médula ósea (MO) de fémures bilaterales por disección suave. Se aislaron células mononucleares del sistema nervioso central (SNC) después de perfusión cardiaca con PBS. Brevemente, se digirieron tejidos del SNC con colagenasa D (2,5 mg/ml; Roche Diagnostics) y DNasal (1 mg/ml; Roche Diagnostics) a 37°C durante 45 minutos. Se aislaron células mononucleares pasando el tejido a través de tamices celulares de 70 μ m (BD Biosciences), seguido de centrifugación en gradiente de Percoll (70%/37%). Se recogieron linfocitos del interfaz 37%/70% y se lavaron. Los siguientes anticuerpos se usaron para inmunotinción: FITC-, PE- o CD3 conjugado con PE-Cy5 (17A2), CD4 (H129.19), CD8 (53-6.7), CD62L (MEL14), CD44 (IM7), B220 (H1.2F3), IgM (II/41), DX5 (CD49b) (todos de BD Biosciences). Para tinción con citocinas intracelular, se estimularon los linfocitos *in vitro* con forbol 12-miristrato 13-acetato (20 ng/ml; Sigma-Aldrich) e ionomicina (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich) en presencia de GolgiStop™ (monensina) (5 μ g/ml) durante 5 horas antes de la tinción. Se construyó un tetrámero MOG₃₈₋₄₉/IAb y un tetrámero control (CLIP/IAb) y se proporcionaron por el NIH Tetramer Core Facility. Se evaluó la tinción de fondo usando mAb control de isotipo coincidente no reactivos. Para análisis de inmunofluorescencia de 2 ó 3 colores, se tiñeron suspensiones de células sencillas (10^6 células) a 4°C usando concentraciones óptimas predeterminadas de mAb durante 20 minutos. Para tinción de tetrámeros, se tiñeron los linfocitos durante 3 horas a 37°C.

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

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

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

Tabla 5

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

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

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

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

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

Se evaluaron las señales clínicas de AIC diariamente con un sistema de puntuación de 0 a 5 puntos: 0, normal; 1, articulación de la pata trasera o
 25 delantera afectada o eritema difuso mínimo e hinchazón; 2, articulaciones de la

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

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

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

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

Los ratones que tienen una puntuación clínica de EAE de 2-3 se
 25 trataron con 28G9 (10 mg/kg, i.p.), SB/14 (10 mg/kg, i.p.) o IgG control (10

mg/kg, i.p.) una vez a la semana durante 2 semanas (los días 0, 7 y 14). 28G9 es anticuerpo de rata para IgG1 y SB/14 (BD Biosciences) es un anticuerpo de rata de IgG2a. Las mutaciones clínicas se controlaron diariamente hasta el día 61.

5 El día 7, los ratones tratados con 28G9 tenían puntuaciones clínicas menores de 2 (N=7). Los ratones tratados con 28G9 mantuvieron puntuaciones clínicas de aproximadamente 2 hasta el fin del estudio (día 61). En comparación, los animales tratados con IgG control tenían puntuaciones clínicas entre 3 y 4 a lo largo del estudio. No se observó reducción de gravedad
10 de la enfermedad con tratamiento con SB/14 en comparación con el control.

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

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

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

Se ensayó un panel de anticuerpos antagonistas de IL-7R en un modelo de ratón para diabetes tipo 1. 28G9 es un anticuerpo monoclonal de IgG1 de rata, 28G9-mIgG2a es un anticuerpo que tiene las regiones variables de 28G9 con región constante IgG2a de ratón y agly-28G9 es un anticuerpo aglucosilado
25 que tiene las regiones variables de 28G9 con IgG2a N297a de ratón. Para

construcción y expresión de 28G9-mIgG2a, se amplificaron los genes VH y Vk de anticuerpo monoclonal de ratón 28G9 mediante PCR, se clonaron en vectores de expresión de mamíferos kappa de ratón pARC e IgG2a de ratón pARC, y se co-transfectaron en células 293F mediante Lipofectamin™
5 (Invitrogen™). Después de 5 días después de la transfección, los medios de cultivo se recolectaron y se purificó IgG2a de ratón 28G9 mediante el uso de resina Mabselect™ (GE). Para la construcción y expresión de agly-28G9, se clonó la VH de 28G9 de rata en un vector de IgG2a de ratón pARC modificado por ingeniería genética en el que se reemplazó Asn-297 del dominio CH2 con
10 Ala (N297A de IgG2a de ratón pARC). Se obtuvo un m28G9 aglucosilado (agly-28G9) por co-transfección de células 293F con N297A de IgG2a de ratón pARC y vector kappa de ratón 28G9 pARC.

Se trató a los ratones NOD diabéticos de nueva aparición espontáneos (es decir, dos concentraciones de glucosa en sangre consecutivas por encima
15 de 250 mg/dl) i.p. semanalmente con 28G9-mIgG2a (10 mg/kg, i.p.), 28G9 (10 mg/kg, i.p.), agly-28G9 (10 mg/kg, i.p.) o IgG control (10 mg/kg, i.p.). Los niveles de glucosa en sangre se controlaron diariamente durante 140 días después de la aparición de la enfermedad. En ratones tratados con 28G9-mIgG2a, se observó una remisión del 100%. En los ratones NOD tratados con
20 28G9-mIgG2a, los niveles de glucosa en sangre se mantuvieron por debajo de 250 mg/dl con inyecciones semanales de 28G9-mIgG2a. 28G9 también mostró algo de eficacia en la reducción de los niveles de glucosa en sangre en comparación con IgG control. Los ratones tratados con agly-28G9 y los ratones tratados con IgG tuvieron niveles de glucosa en sangre de más de 250 mg/dl a
25 lo largo del estudio. Estos resultados demuestran que el anticuerpo antagonista

de IL-7R 28G9- mlgG2a es altamente eficaz en la reducción de los niveles de glucosa en sangre en ratones con diabetes de tipo 1 establecida.

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

Tabla 6

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

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

10 Los resultados de los estudios descritos anteriormente demuestran que el anticuerpo antagonista de IL-7R 28G9-mIgG2a era altamente eficaz en la reducción de los niveles de glucosa en sangre en animales con diabetes de nueva aparición. Además, los ratones tratados con solamente dos o tres dosis de anticuerpos antagonistas de IL-7R mantuvieron niveles de glucosa en
15 sangre por debajo de 250 mg/dl durante varios meses después de que se administrara el anticuerpo.

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

20 Este ejemplo ilustra el efecto de los anticuerpos antagonistas de IL-7R

en modelos de ratón para enfermedad de injerto contra huésped aguda y crónica (GVHD).

GVHD aguda

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

GVHD crónica

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

NOD.SCID IL2R γ ^{-/-} (The Jackson Laboratory). cGVHD se desarrolló 16-20 semanas después del trasplante.

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

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

comparación con el cambio de suave a moderado en el bazo de ratones tratados con PBS.

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

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

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

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

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

segundos se sacrificaron. La tasa de supervivencia se resume en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Tratamiento	Tasa de supervivencia a las 8 semanas después de la aparición de la enfermedad	Tasa de supervivencia a las 12 semanas después de aparición de la enfermedad
28G9-mIgG2a 1 mg/kg	60%	50%
28G9-mIgG2a 3 mg/kg	80%	70%
28G9-mIgG2a 10 mg/kg	90%	80%
agly-28G9 1 mg/kg	100%	100%
IgG control de isotipo (control negativo)	60%	60%
Ciclofosfamida (control positivo)	80%	80%

- 5 Como se muestra en la Tabla 7, los ratones tratados con agly-28G9 1 mg/kg, 28G9-mIgG2a 3 mg/kg o 28G9-mIgG2a 10 mg/kg tuvieron una tasa de supervivencia aumentada en comparación con ratones tratados con IgG control de isotipo. Estos resultados indican que los anticuerpos antagonistas de IL-7R son eficaces en la reducción de la gravedad de la enfermedad en un modelo
- 10 animal para lupus.

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

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

- Basándose en la estructura cristalina del complejo IL-7/IL-7R α y la
- 15 probable implicación de ciertos restos en unión de IL-7 (McElroy y col., 2009, Structure, 17 (1):54-65), se seleccionaron veintitrés mutantes de restos

superficiales de IL-7R α (N29D, V58S, E59R, R66N, K77S, L80S , I82S, K84S, K100S, T105A, N131S, Q136K, K138S, Y139F, K141S, M144A, D190S, H191N, Y192A, Y192F, K194S, K194A y F196S) para mutación para mapear los epítomos de unión a anticuerpo. La numeración de los mutantes (es decir, 5 N29D, V58S, E59R, etc.) sigue la convención de proteína post-procesamiento en la que no se cuentan los primeros 20 aminoácidos.

Un panel de mutantes puntuales de IL-7R α (marcados con his) se preparó como sigue. Los veintitrés mutantes puntuales de IL-7R α descritos anteriormente se generaron a partir de la construcción de ADN de tipo silvestre 10 descrita anteriormente (McElroy y col., 2009, mencionada anteriormente) usando técnicas de ADN convencionales. Las proteínas mutantes se expresaron usando transfección transitoria en células HEK293T y se secretaron a los medios celulares. Las proteínas mutantes se purificaron mediante cromatografía en columna de Ni²⁺. Las concentraciones de proteínas se 15 midieron mediante espectrofotometría (NanoDrop™).

Se realizó un análisis de interacción de IL-7R α a 25°C usando un biosensor XPR36 de ProteOn™ basado en resonancia de plasmón superficial equipado con una microplaca sensora GLM (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). Se usó tampón de ejecución HBST (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 20 mM, Tween-20 0,05% v/v) en todo el ensayo. Los anticuerpos de IL-7R de longitud completa (HAL403a o HAL403b) se acoplaron con amina en canales “verticales” separados de la microplaca mediante química mediada por EDC/sulfo-NHS convencional hasta niveles de aproximadamente de 2000-5000 UR. El panel de mutantes de IL-7R α (incluyendo IL-7R α de tipo silvestre) se 25 exploró en la dirección “horizontal” a 100 nM usando fases de asociación y

disociación de 3 y 10 minutos respectivamente a 30 μ l/minuto. Se regeneraron superficies con tampón de elución inmunopuro Pierce 2/1 v/v (pH 2,8)/NaCl 4M. La mayoría de las inyecciones se duplicaron para confirmar que el ensayo era reproducible.

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

Tabla 8

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

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

de efectos mutantes se identificaron como sigue: I82 (impacto alto en la unión), K84 (impacto medio), K100 (impacto medio), T105 (impacto medio), Y192 (impacto medio), D190 (impacto pequeño), H191 (impacto pequeño) y K194 (impacto pequeño).

5 Aunque las enseñanzas desveladas se han descrito con referencia a diversas aplicaciones, procedimientos, kits y composiciones, se apreciará que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones sin apartarse de las enseñanzas del presente documento y la invención reivindicada posteriormente. Los ejemplos anteriores se proporcionan para ilustrar mejor las
10 enseñanzas desveladas y no pretenden limitar el ámbito de las enseñanzas presentadas en el presente documento. Aunque las presentes enseñanzas se han descrito en términos de estas realizaciones ejemplares, el experto en la materia entenderá fácilmente que son posibles numerosas variaciones y modificaciones de estas realizaciones ejemplares sin experimentación
15 indebida. Todas las variaciones y modificaciones tales están dentro del ámbito de las enseñanzas actuales.

Todas las referencias citadas en el presente documento, incluyendo patentes, solicitudes de patentes, artículos, libros de texto y similares, y las referencias citadas en ellos, en tanto que no lo están ya, se incorporan en el
20 presente documento por referencia en su totalidad. En caso de que una o más de la bibliografía incorporada y materiales similares difieran de o contradigan esta solicitud, incluyendo pero sin limitación los términos definidos, uso de los términos, técnicas descritas o similares, la presente solicitud prevalece.

Los anteriores ejemplos y descripción detallan ciertas realizaciones
25 específicas de la invención y describen el mejor modo contemplado por los

inventores. Se apreciará, sin embargo, que independientemente de cuan detallado pueda aparecer lo anterior en el texto, la invención puede practicarse de muchas formas y la invención solo debería interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualquier equivalente de las mismas.

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES

5

1. Un anticuerpo del receptor de interleucina 7 (IL-7R) aislado que se une específicamente a IL-7R y comprende una región de unión a antígeno que compete de forma cruzada, con un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a, HAL403b, C1GM
10 y C2M3, por la unión a IL-7R.

15

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende los restos I82, K84, K100, T105 y Y192 del receptor de interleucina 7 alfa humano (IL-7R α).

20

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que epítipo comprende además uno o más restos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los restos D190, H191 y K194 de IL-7R α humano.

25

4. Un anticuerpo aislado que se une específicamente al receptor de interleucina 7 alfa (IL-7R α), en el que el anticuerpo comprende una región de determinación de complementariedad uno (CDR1) de una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos X₁X₂VMH, en la que X₁ es D o N; X₂ es S o Y (SEC ID N° 50), una CDR2 de VH que tiene la
25 secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃X₄X₅GX₆X₇TTYADSVKG, en la que X₁ es L o

A; X₂ es V o I; X₃ es G o S; X₄ es W o G; X₅ es D o S; X₆ es F, G o S; X₇ es F, A o S (SEC ID N° 51), y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈, en la que X₁ es Q o D; X₂ es G o I; X₃ es D o S; X₄ es Y o G; X₅ es M, V o G; X₆ es G o F; X₇ es N, D o M; X₈ es N, Y o D (SEC ID N° 52),

5 una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos TX₁SSGX₂IX₃SSYVQ en la que X₁ es R o G; X₂ es S o R ; X₃ es D o A (SEC ID N° 53), una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos EDX₁QRPS en la que X₁ es D o N (SEC ID N° 54) y una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos X₁X₂YX₃X₄X₅X₆LX₇ en la que X₁ es Q o M; X₂ es S o

10 Q; X₃ es D o A; X₄ es F o S; X₅ es H o S; X₆ es H o S; X₇ es V o W (SEC ID N° 55), en el que el anticuerpo bloquea la fosforilación de STAT5 en un ensayo de activación de STAT5.

5. Un anticuerpo aislado que se une específicamente al receptor de

15 interleucina 7 alfa (IL-7R α), en el que el anticuerpo comprende una región determinante de complementariedad uno (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos DSVMH (SEC ID N° 19), GFTFDDS (SEC ID N° 46), o GFTFDDSVMH (SEC ID N° 47), una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID N°

20 23) o GWDGFF (SEC ID N° 48), una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos QGDYMGNN (SEC ID N° 49), una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID N° 29), una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos EDDQRPS (SEC ID N° 31) y una CDR de VL que tiene la secuencia de

25 aminoácidos QSYDFHHLV (SEC ID N° 36).

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que la región VH comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 40 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 41.

5

7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 43 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 42, con o sin la lisina C terminal de SEC ID N° 42.

10

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante.

9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es de la subclase IgG1 o IgG2Δa humana.

15

10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Una línea celular que produce de forma recombinante el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

20

12. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

25

13. Un procedimiento para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmune en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que padece o está en riesgo de un trastorno autoinmune, mejorando y/o
5 previniendo de este modo uno o más síntomas del trastorno autoinmune, en el que el trastorno autoinmune se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus y esclerosis múltiple.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la administración del
10 anticuerpo antagonista de IL-7R da como resultado poblaciones reducidas de linfocitos T vírgenes y activados en el individuo en comparación con antes de la administración.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que las poblaciones de
15 linfocitos T reducidas en el individuo comprenden linfocitos T_H1 y/o T_H17 .

16. Un procedimiento para tratar y/o prevenir diabetes tipo 2 en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-7R a un individuo que padece o está en riesgo
20 de diabetes tipo 2, mejorando y/o previniendo de este modo uno o más síntomas de diabetes tipo 2.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que el antagonista de IL-7R es un anticuerpo antagonista de IL-7R.

18. Un procedimiento para tratar y/o prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en un individuo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista de IL-7R a un individuo que padece GVHD, mejorando de este modo uno o más síntomas de GVHD.

5

19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, 17 ó 18, en el que el anticuerpo es el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

RESUMEN

La presente invención proporciona anticuerpos antagonizantes que se unen al receptor de interleucina 7 (IL-7R). La invención proporciona
5 adicionalmente un procedimiento para obtener tales anticuerpos y ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos. La invención se refiere adicionalmente a procedimientos terapéuticos para el uso de estos anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos para el tratamiento y/o la prevención de diabetes tipo 2 y trastornos inmunológicos, incluyendo diabetes tipo 1,
10 esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de injerto contra huésped y lupus.

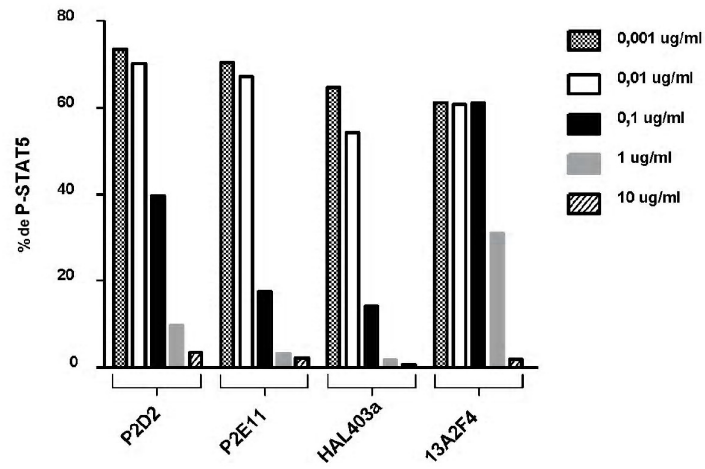


Figura 1

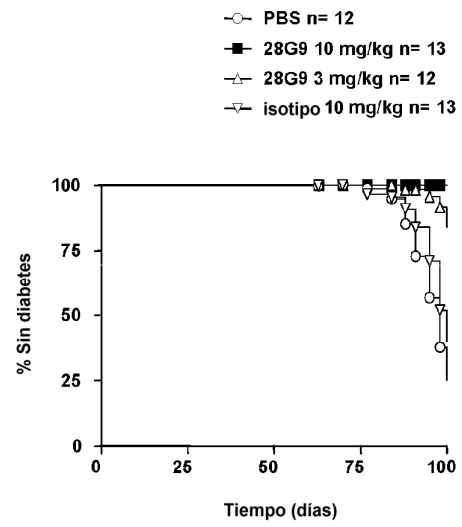


Figura 2

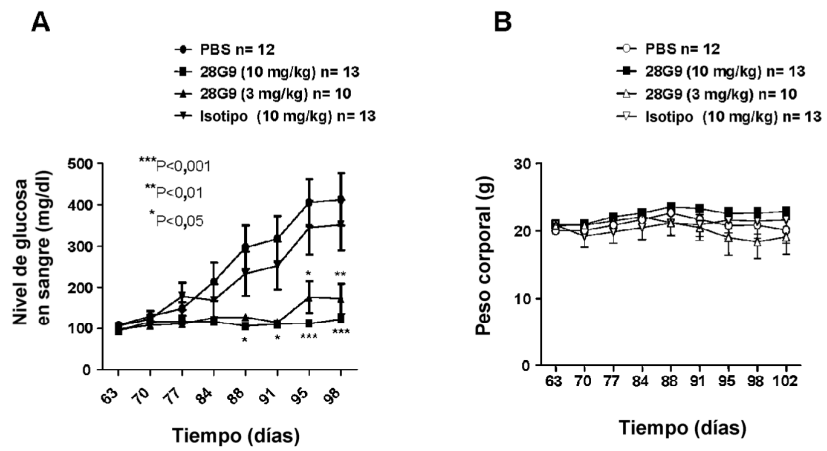


Figura 3

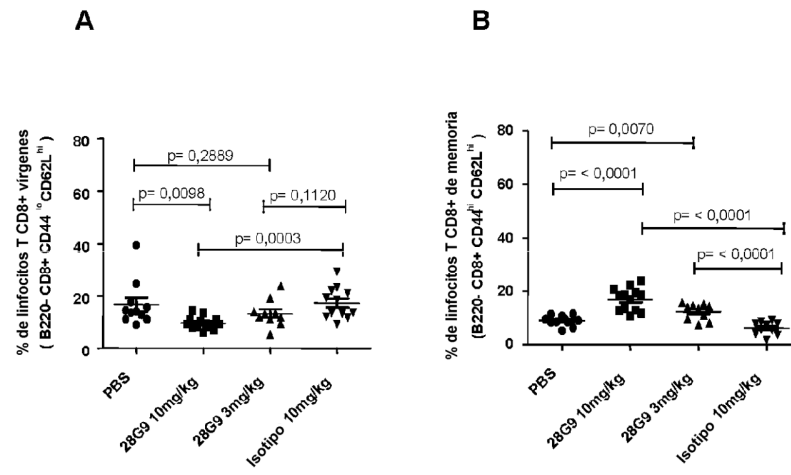


Figura 4

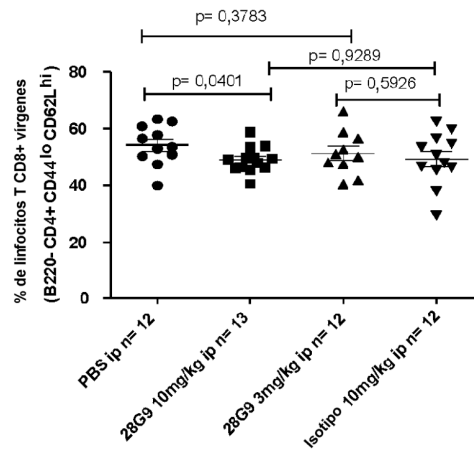


Figura 5

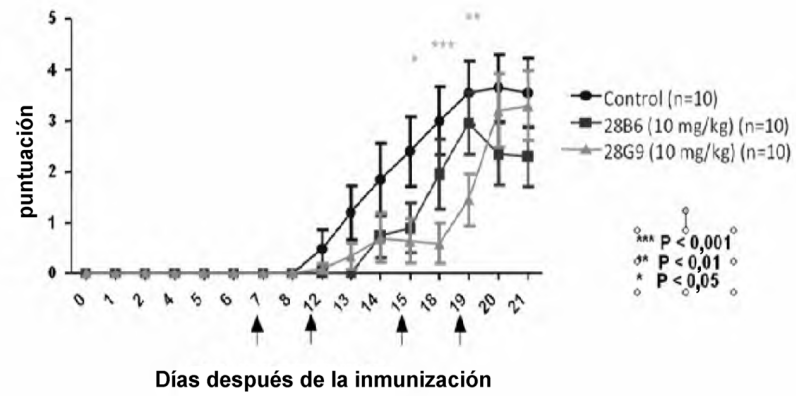


Figura 6

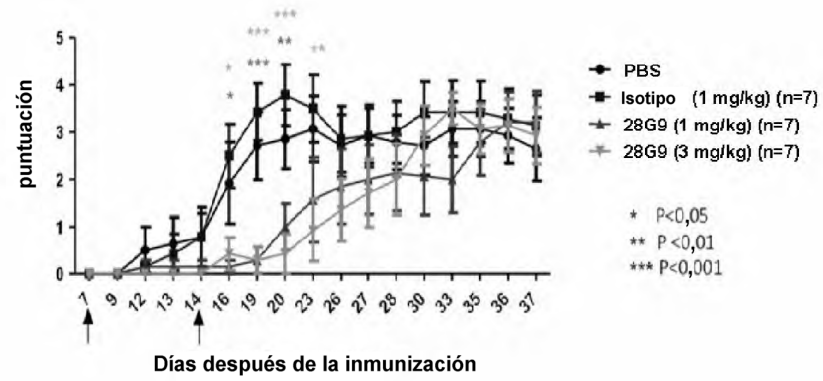


Figura 7

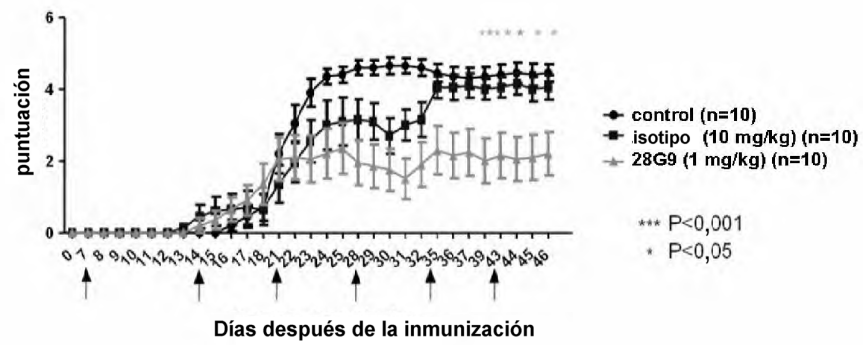


Figura 8

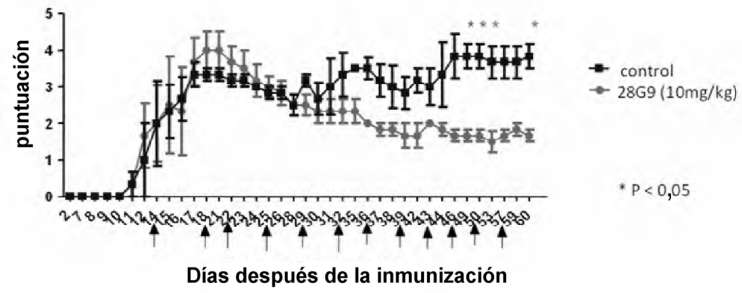


Figura 9

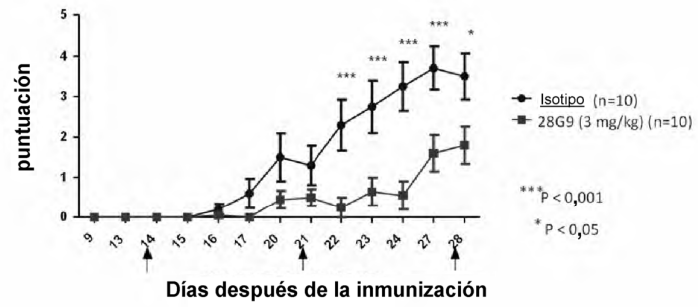


Figura 10

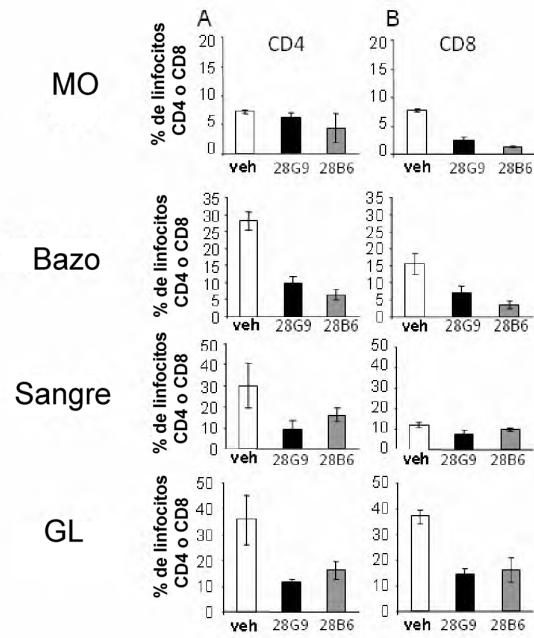


Figura 11

Figura 12A

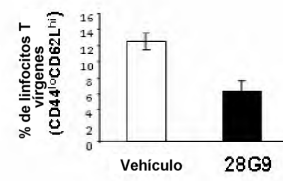


Figura 12B

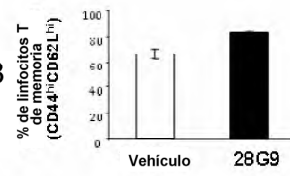
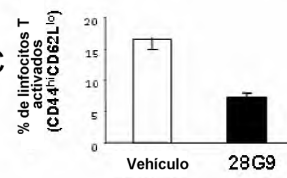


Figura 12C



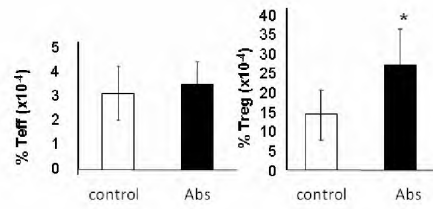


Figura 13

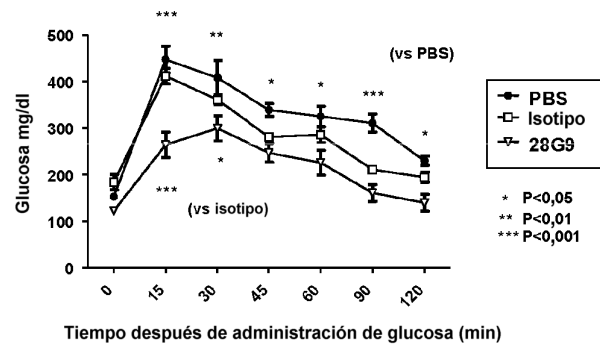


Figura 14

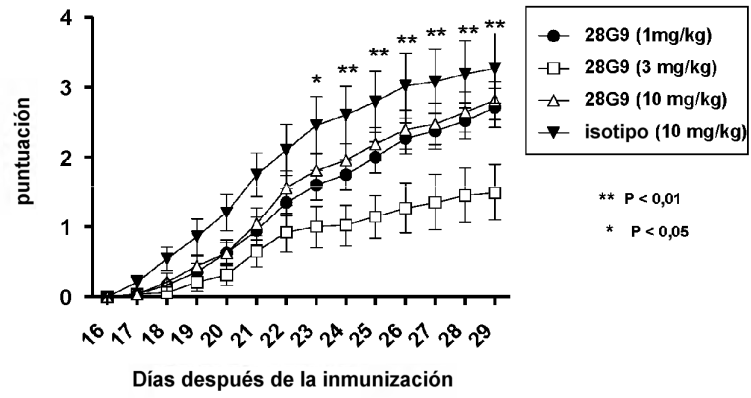


Figura 15

FIG. 1

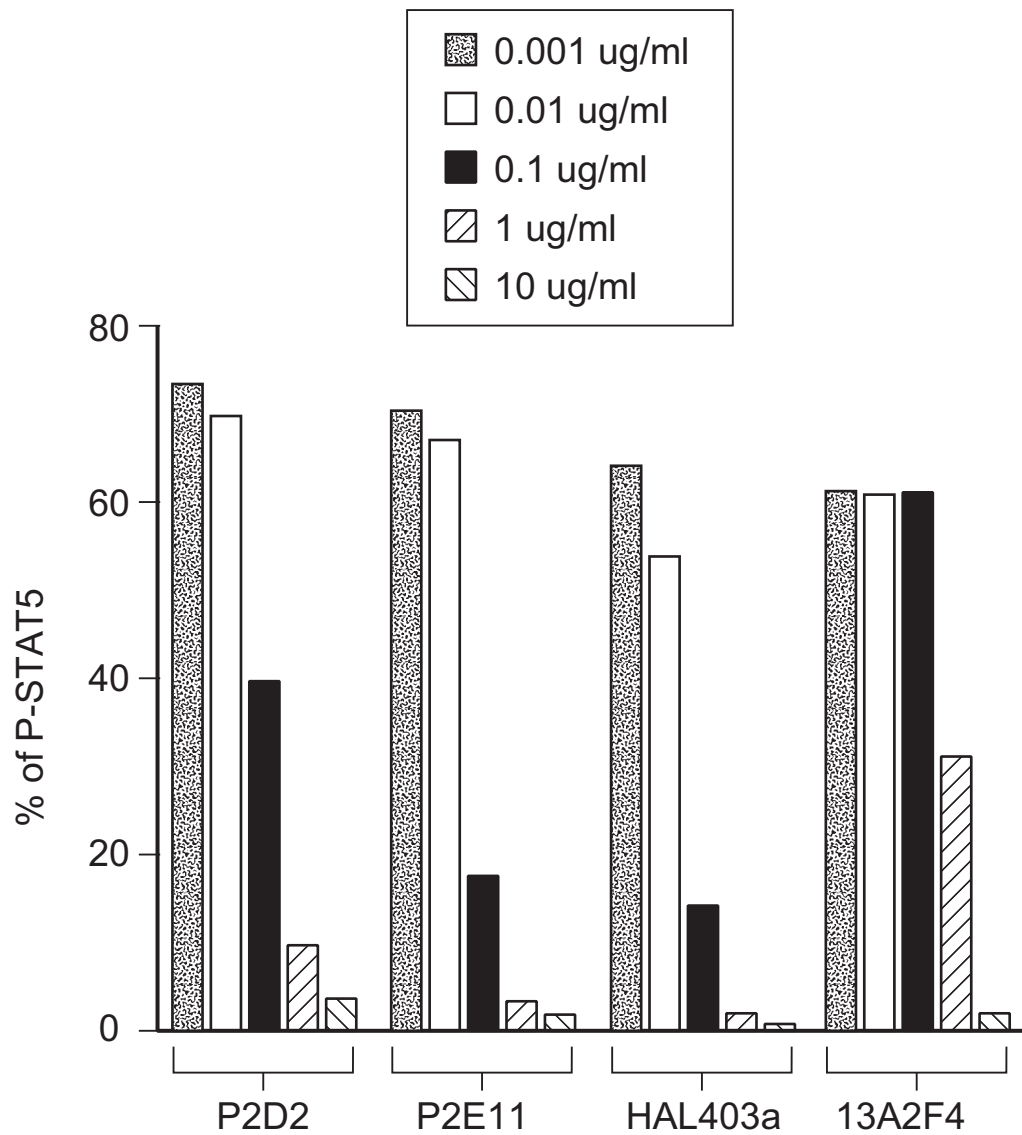
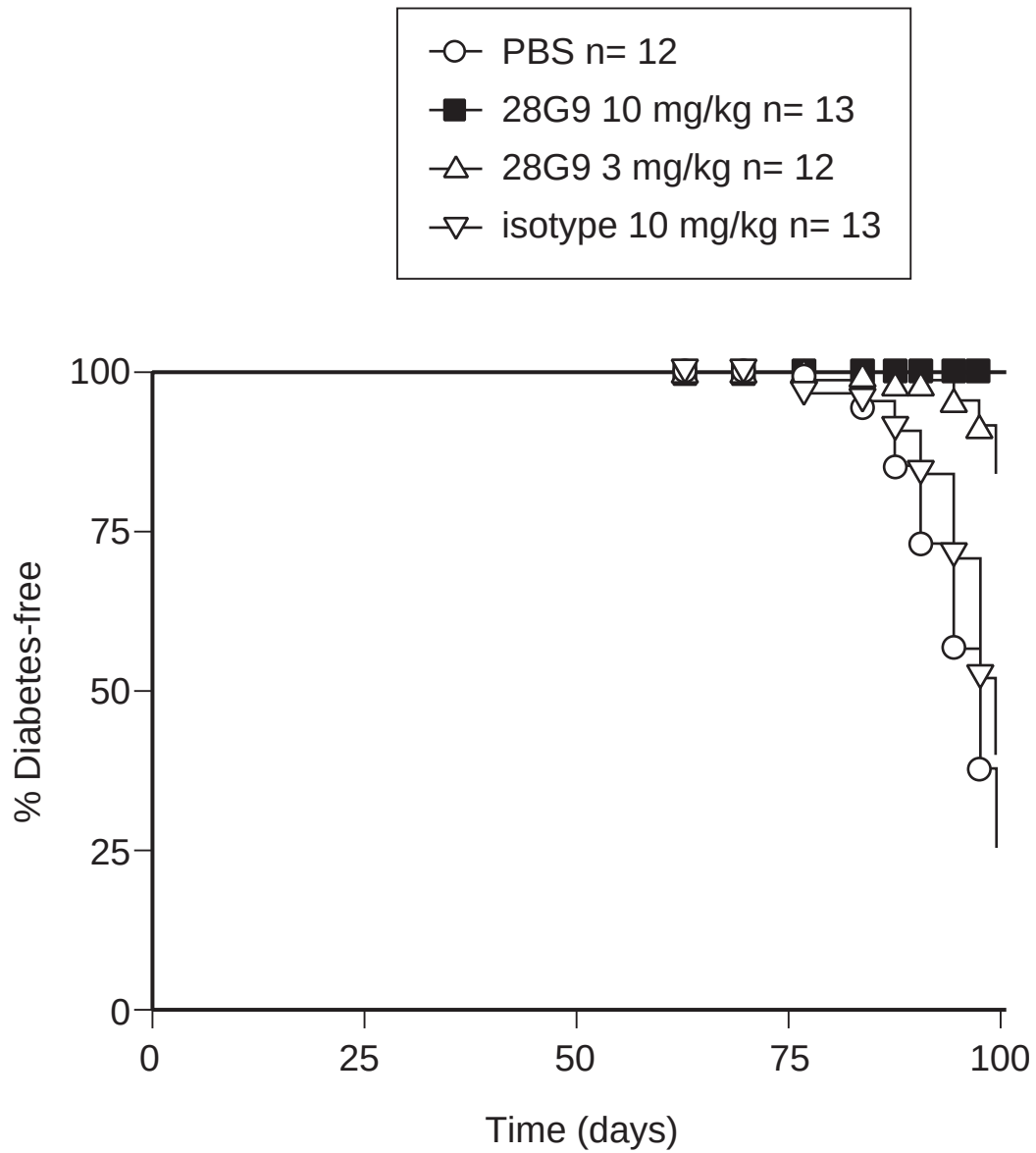


FIG. 2



3/15

FIG. 3A

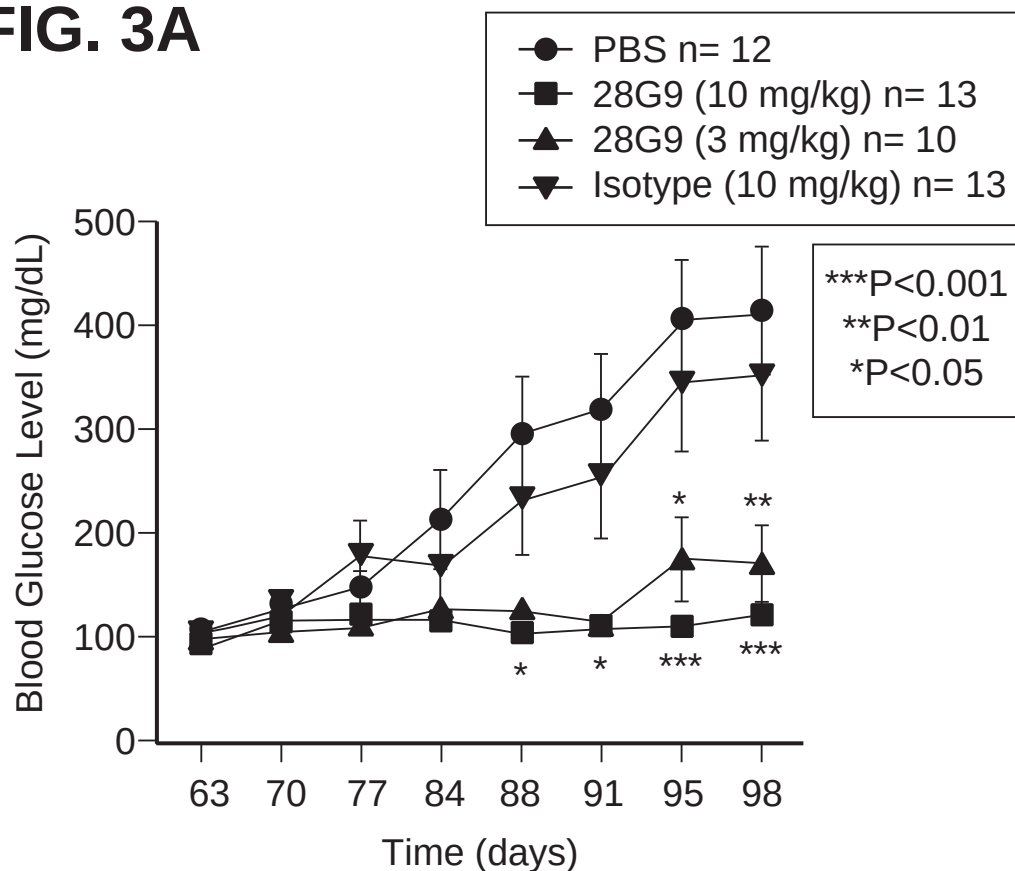


FIG. 3B

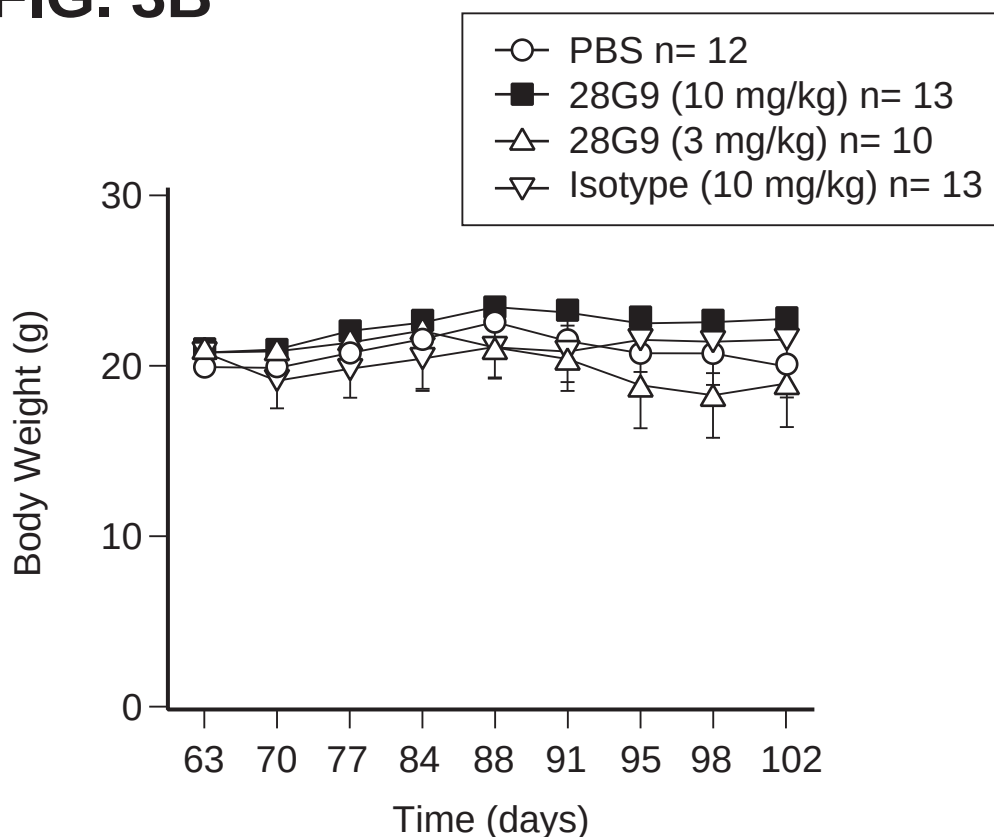


FIG. 4A

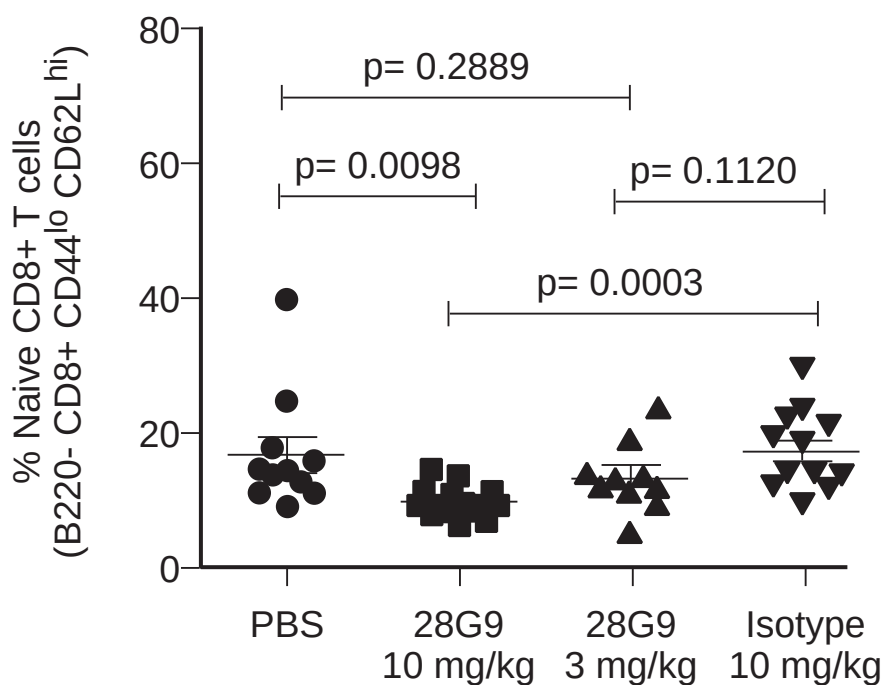


FIG. 4B

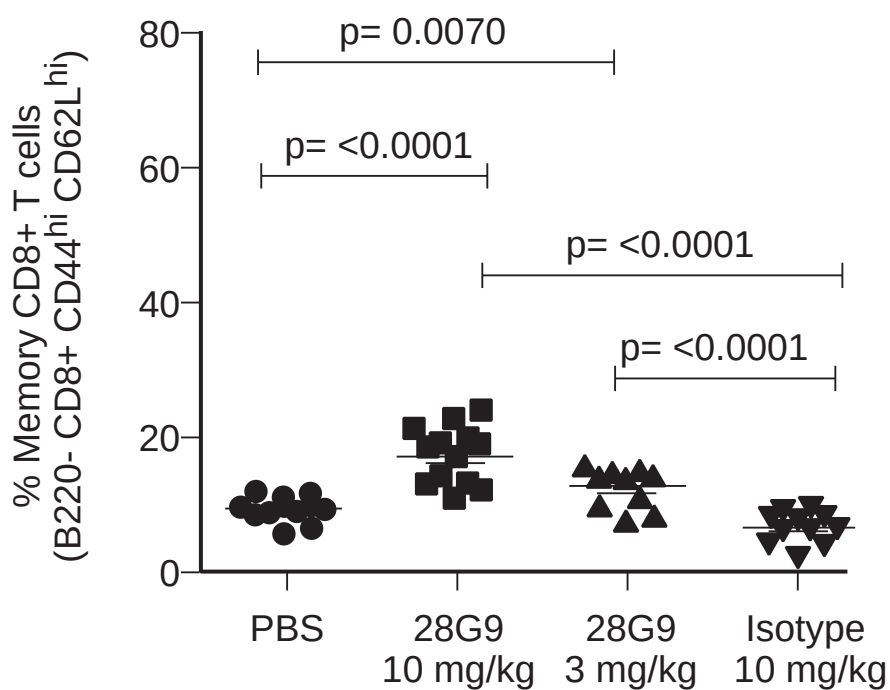


FIG. 5

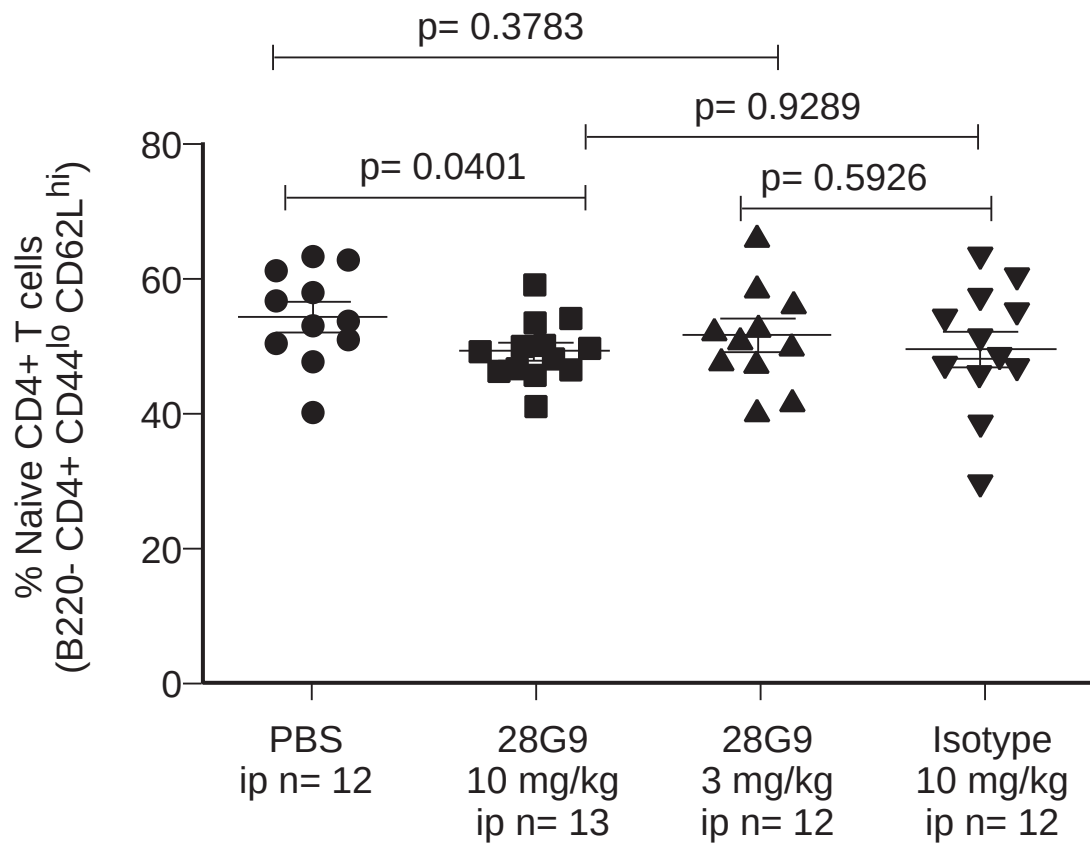


FIG. 6

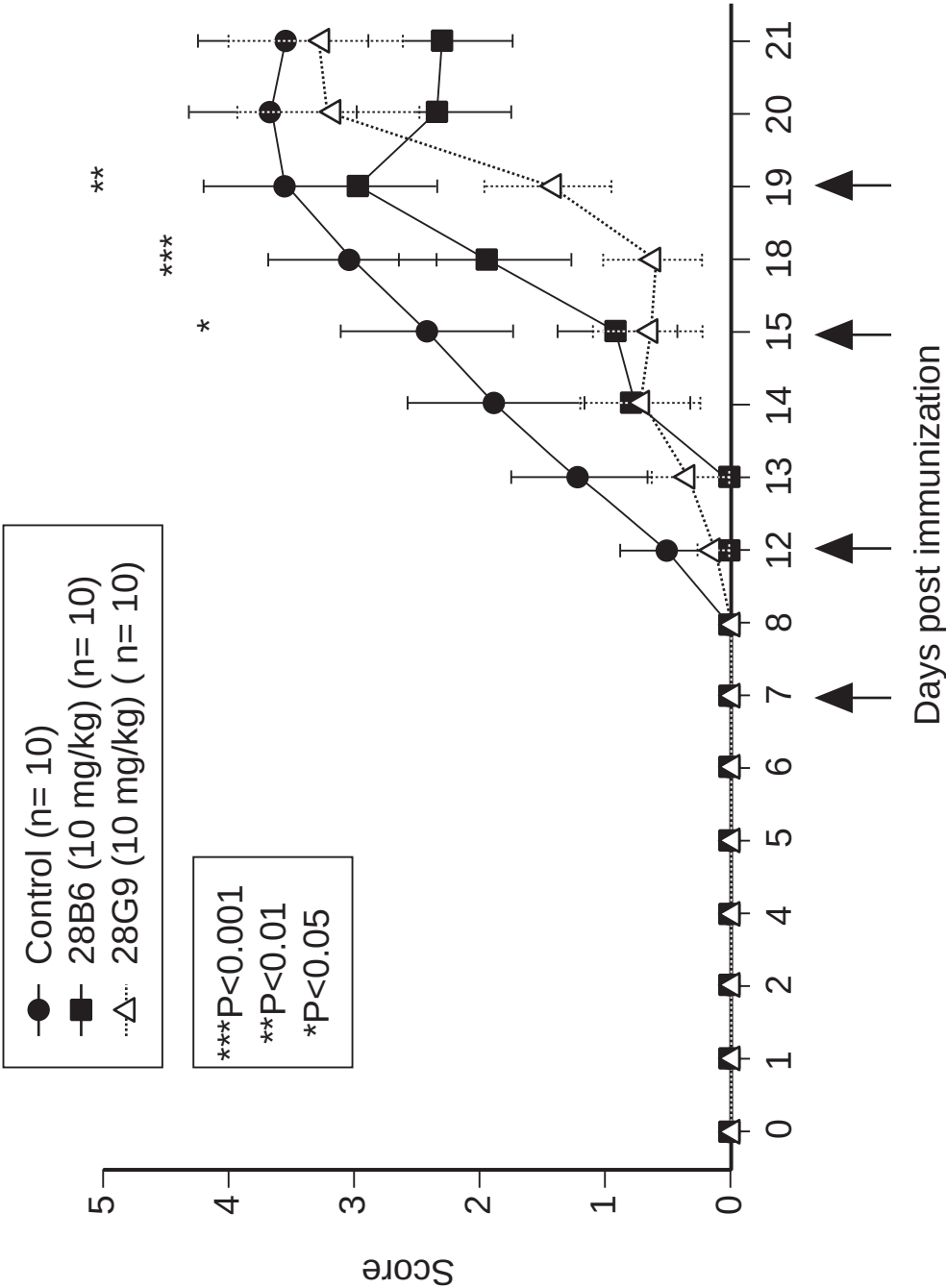


FIG. 7

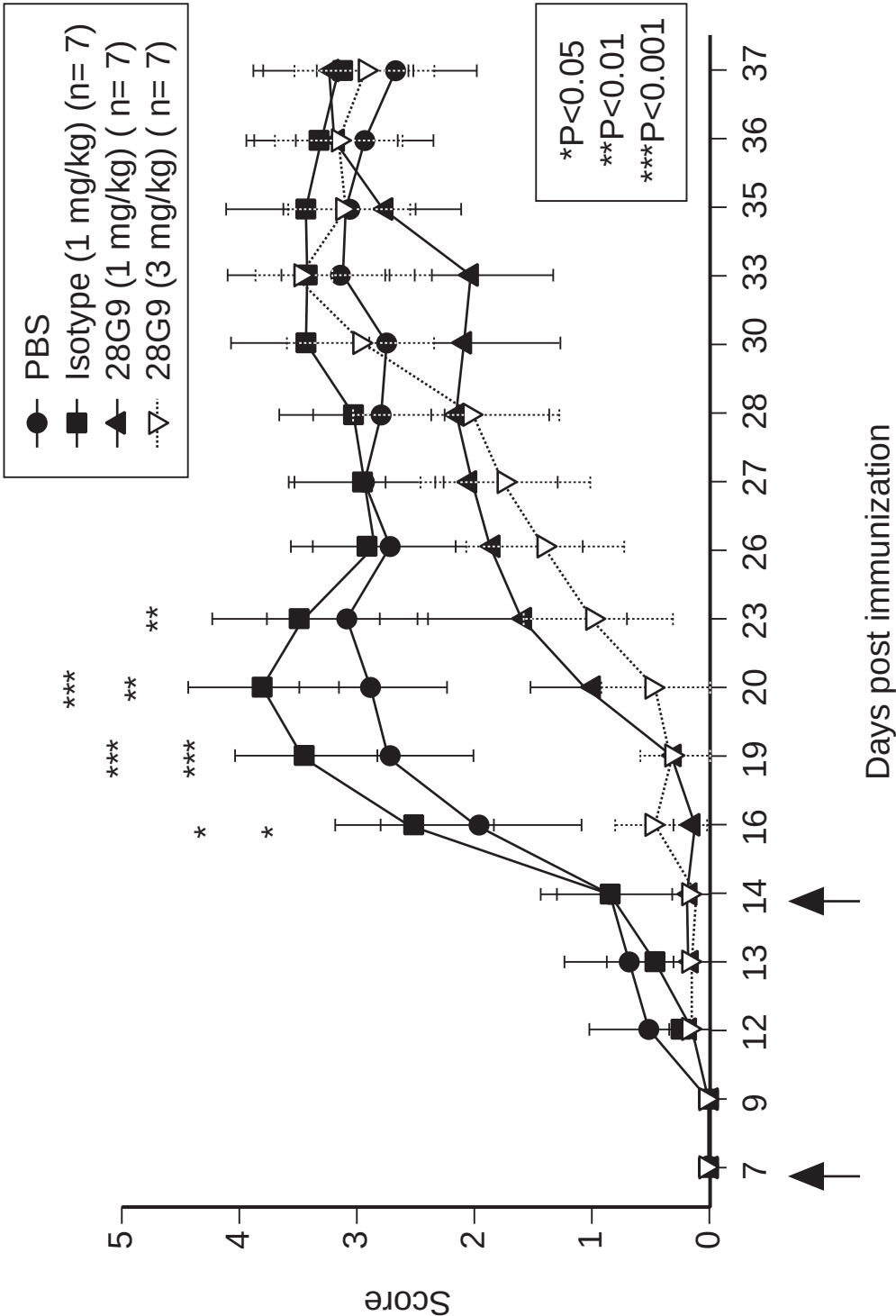
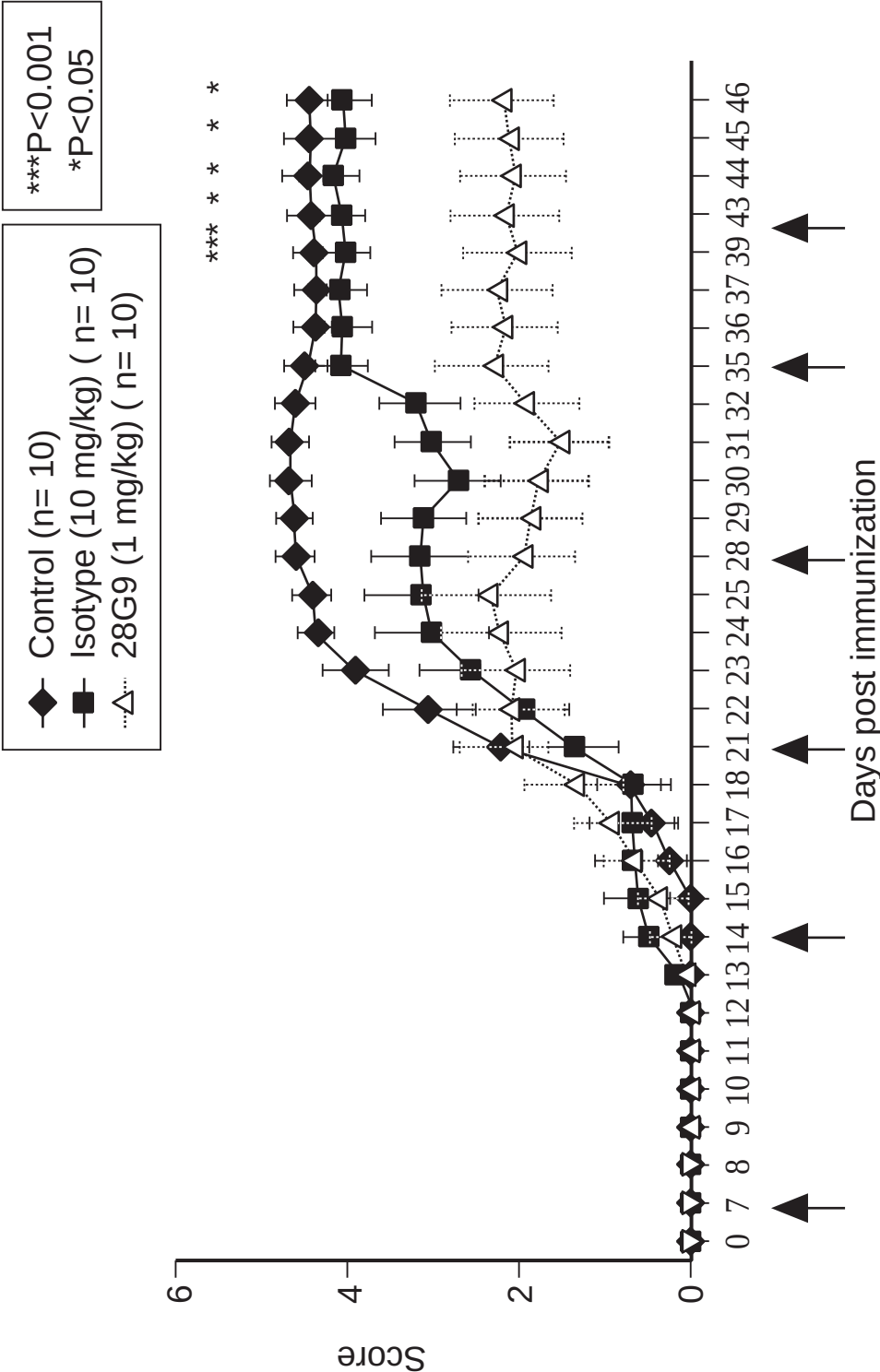


FIG. 8



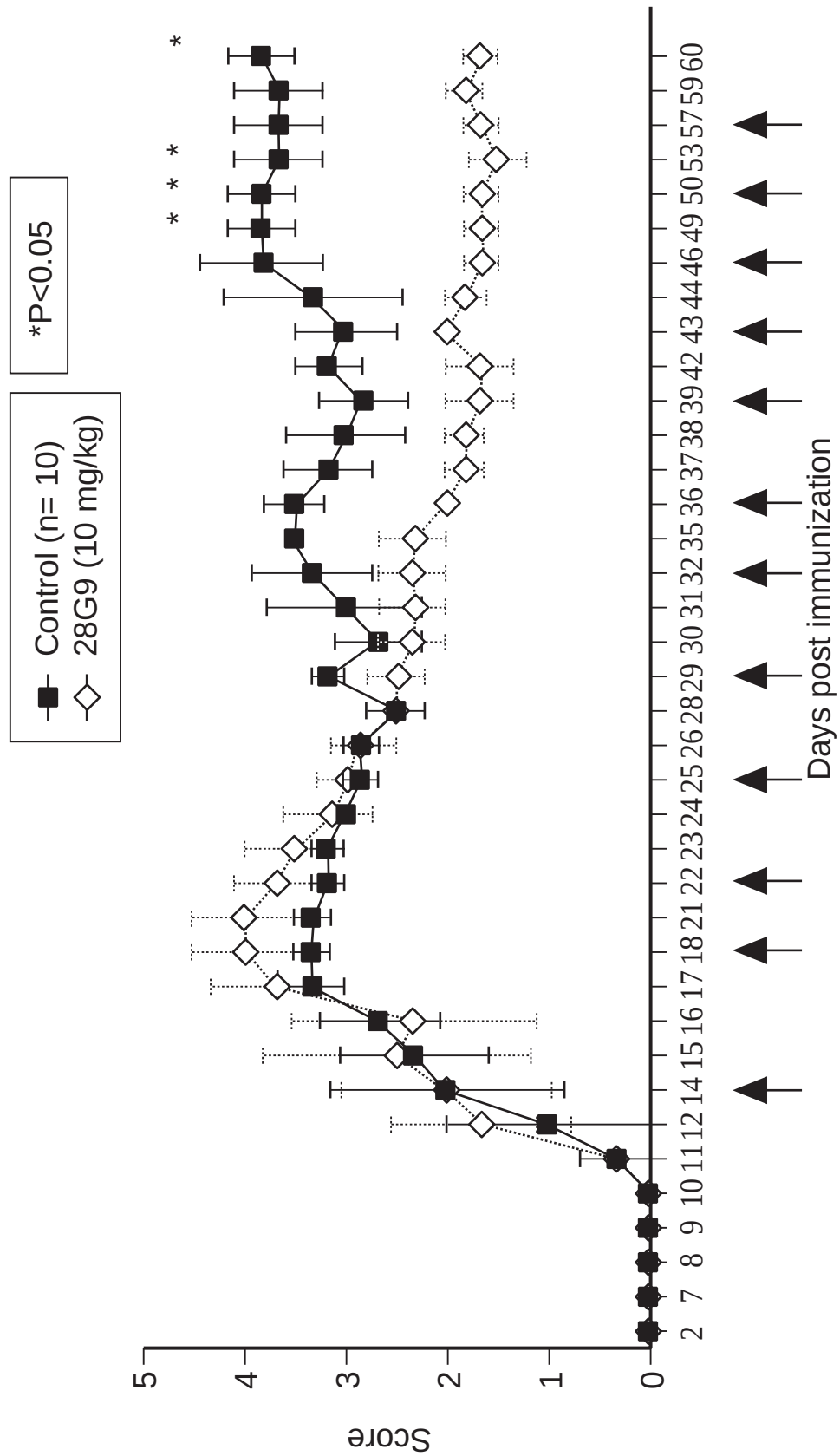
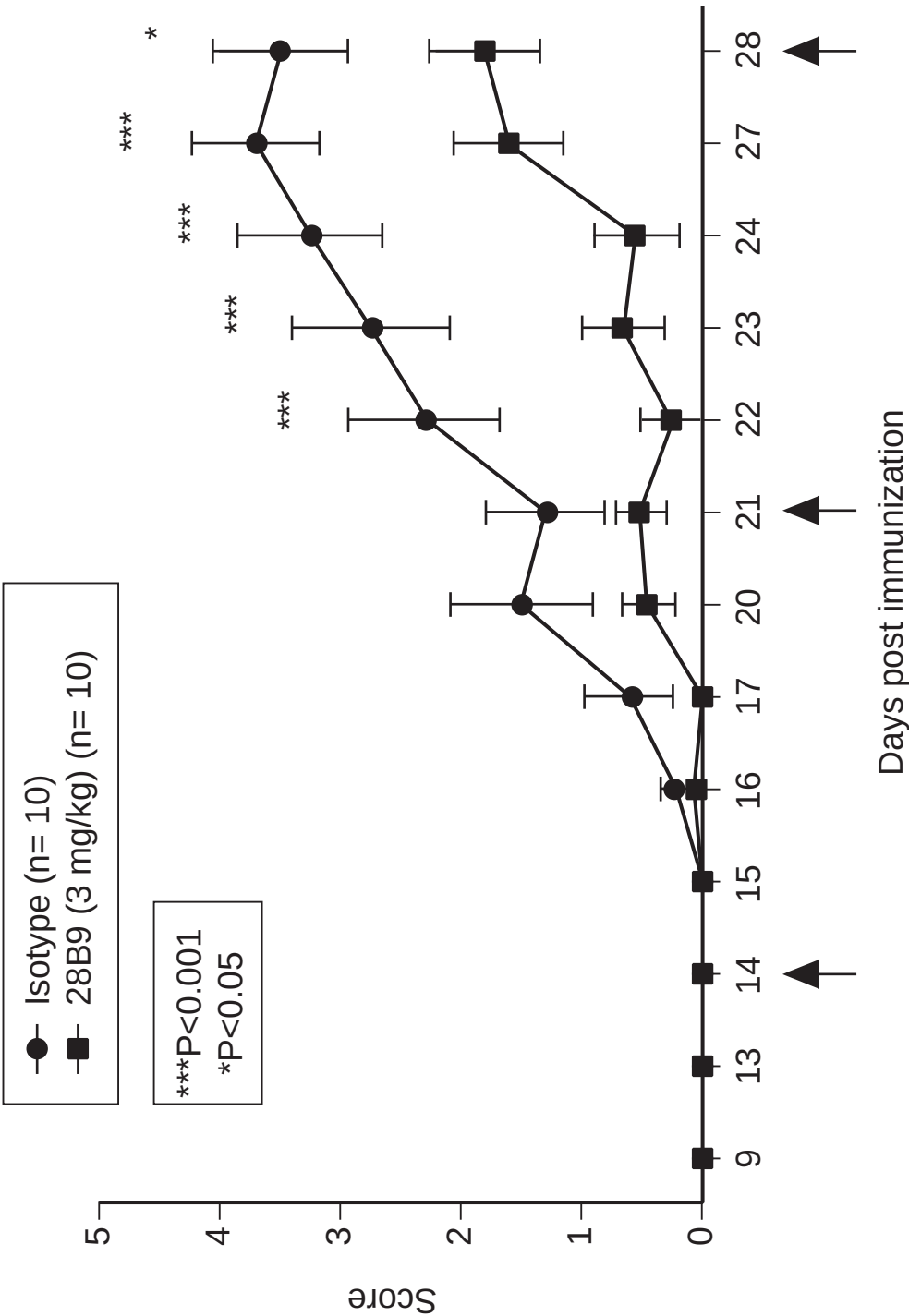


FIG. 10



11/15

FIG. 11A

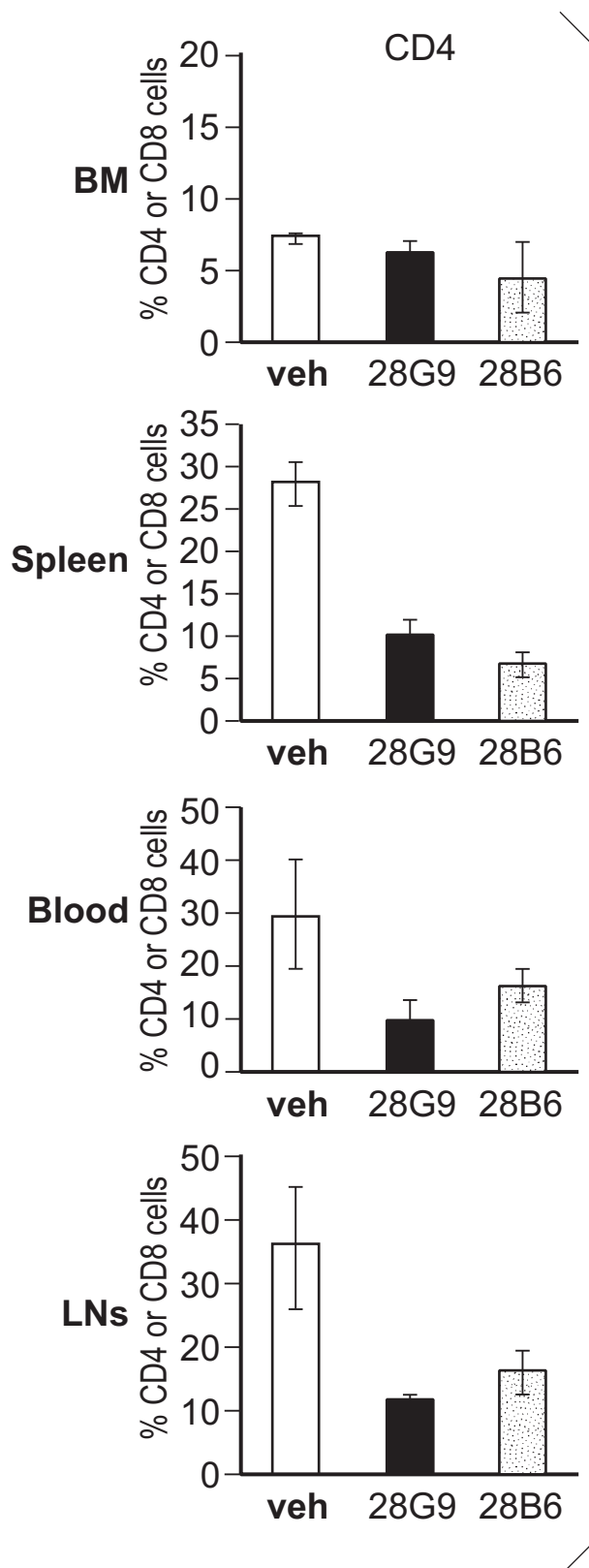
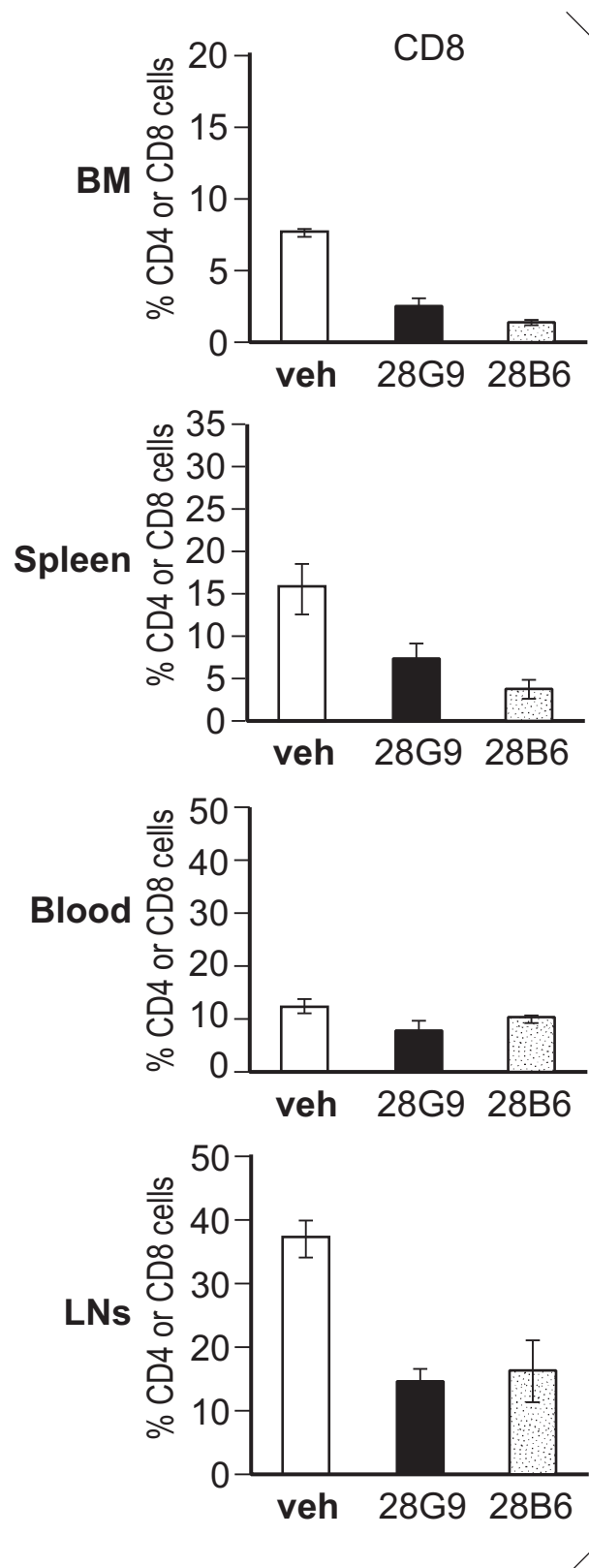


FIG. 11B



12/15

FIG. 12A

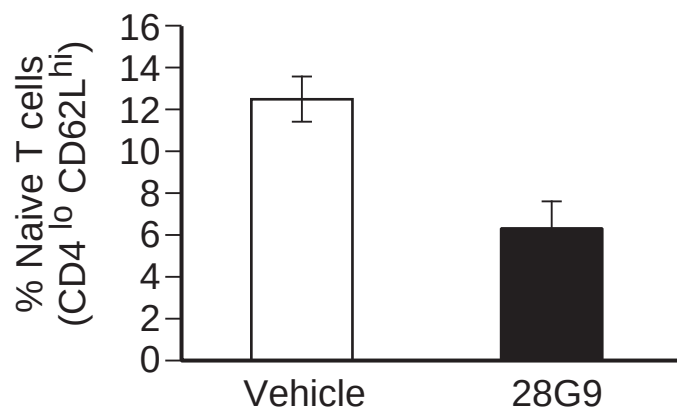


FIG. 12B

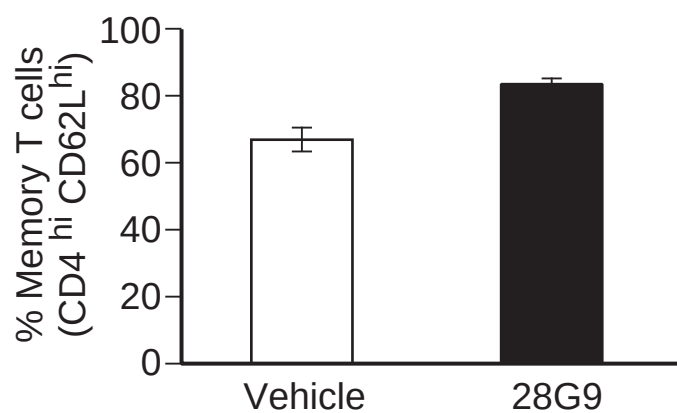


FIG. 12C

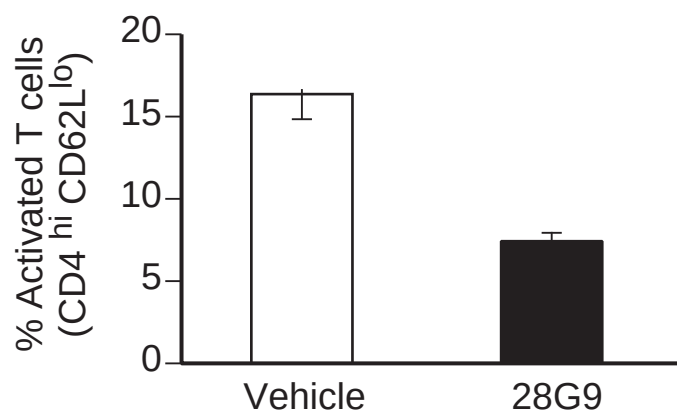


FIG. 13

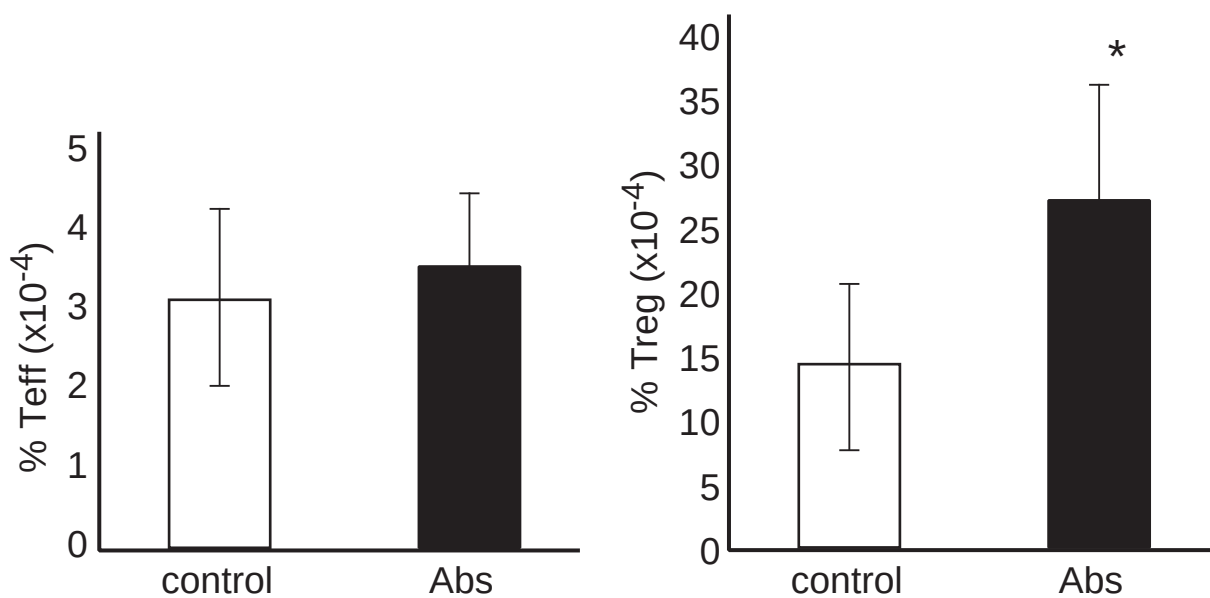


FIG. 14

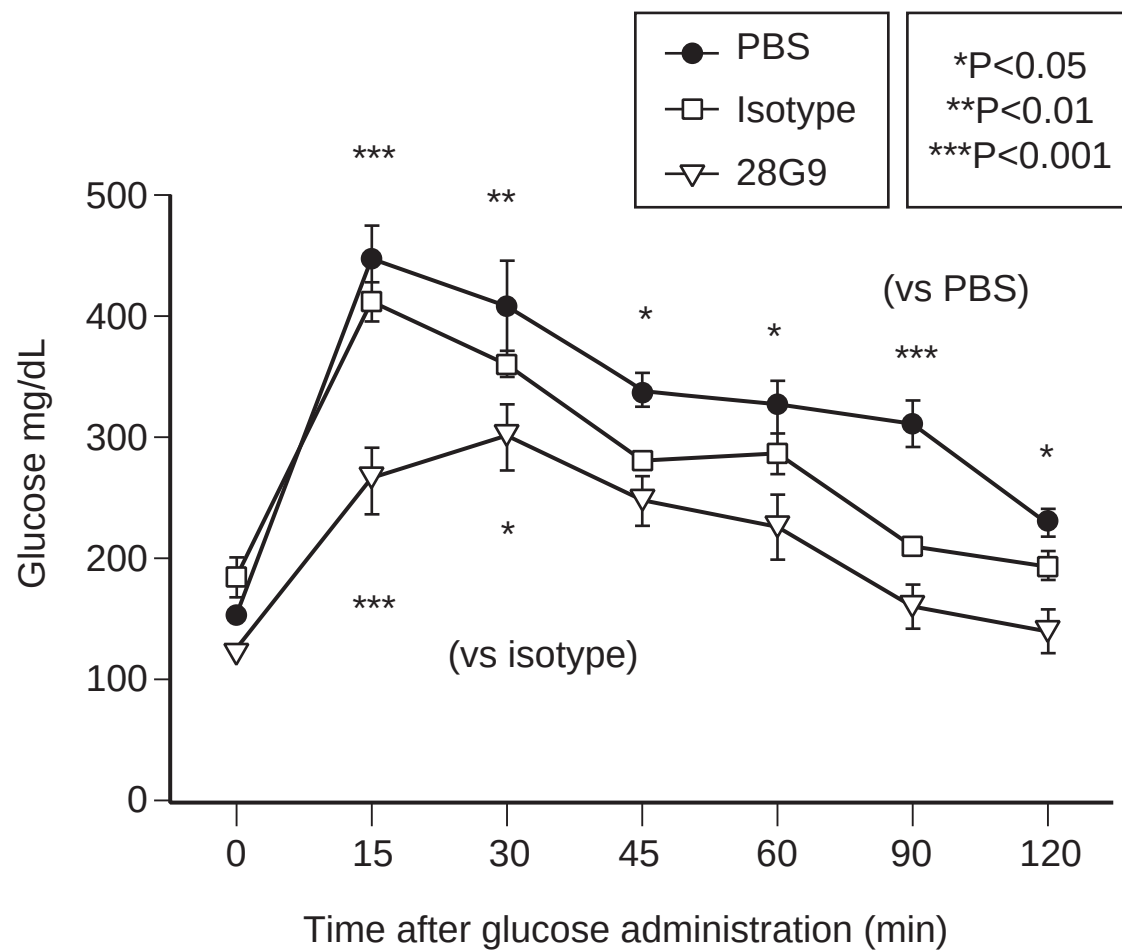
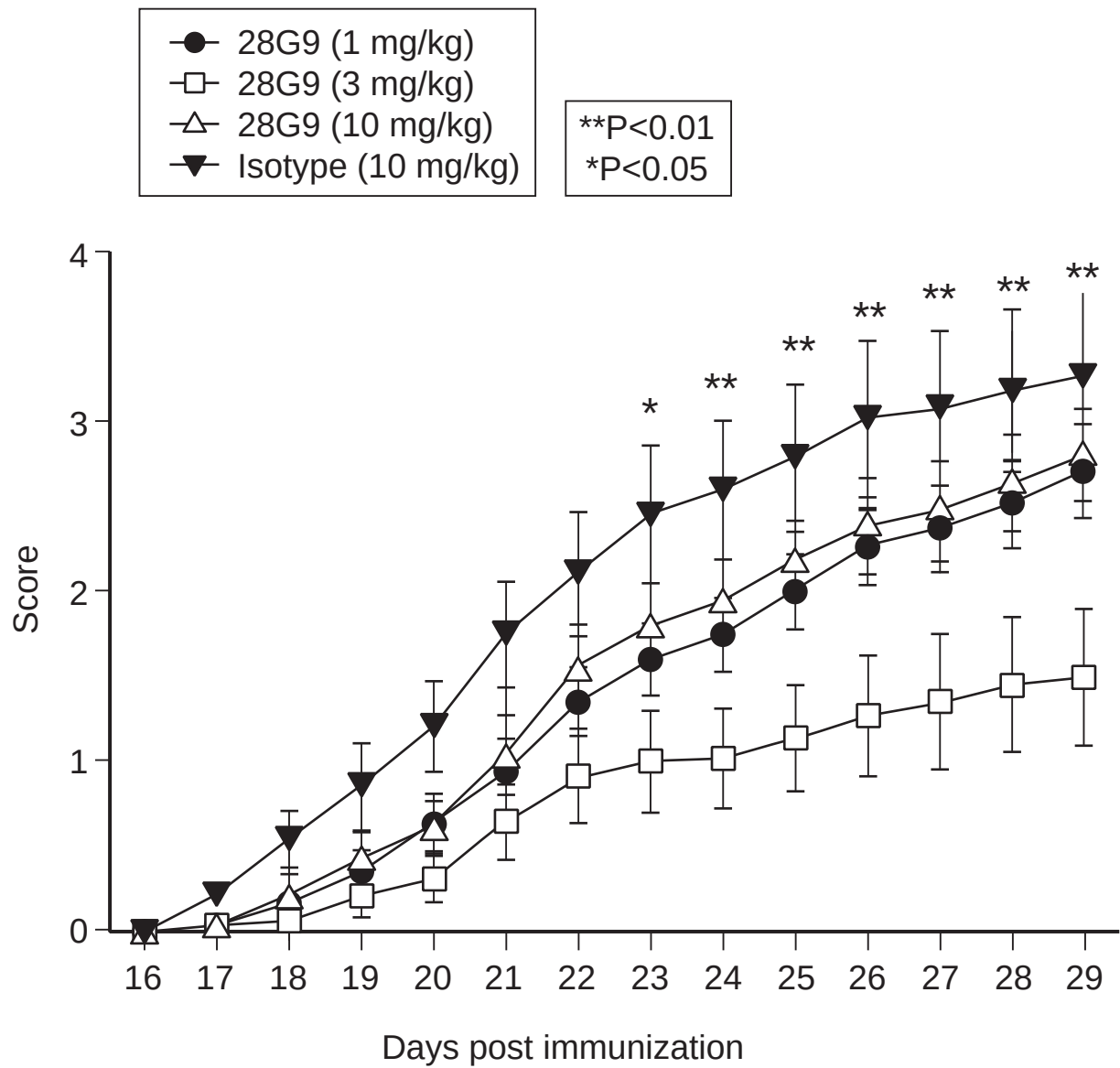


FIG. 15



120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-
SEQUENCE LISTING

<110> Rinat Neuroscience Corporation

<120> ANTAGONIST ANTI-IL-7 RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS

<130> PC33990A

<140> 61/438,205

<141> 2011-01-31

<150> 61/307,670

<151> 2010-02-24

<160> 61

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<210> 4
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

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

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

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

<210> 6
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

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

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

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

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 111
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linking peptide

<400> 13

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

<210> 14
<211> 351
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
caggtcaact taagggagtc tgggggaggc ctggtcaagc cggggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattctgtca tgcactgggt ccgtcaagct 120
ccggggaagg gtctggagtg gctctctctt gttggttggg atggtttttt tacatactat 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acaccaagaa cttactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacaaggg 300
gattacatgg ggaacaactg gggccaggga accctgggtca ccgtctcctc a 351

<210> 15
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcgggggtctc cgggaaagac ggtgaccatc 60
tcctgcaccc gcagcagtgg cagcattgac agttcctatg tgcagtggta ccagcagcgc 120

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

ccgggcaatt cccccaccac tgtgatctat gaggatgacc aaagaccctc tggggtcctt 180
gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
ctggtgactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtcctt atgattttca tcatctggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta tgt 333

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> linker peptide

<400> 16

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

<210> 17
<211> 431
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

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

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

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

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

Val₂₉₀ Leu Thr Val Val His₂₉₅ Asp Trp Leu Asn₃₀₀ Gly Lys Glu Tyr Lys

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

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

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

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

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

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

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

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

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

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

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Ser Val Met His
1 5

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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

Gly

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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

Gly

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

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

Gly

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

<400> 24

Gln Gly Asp Tyr Val Phe Asp Tyr
 1 5

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

<400> 25

Asp Ile Ser Gly Gly Gly Met Asp Val
 1 5

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

<400> 26

Gln Gly Asp Tyr Val Phe Asn Asn
 1 5

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

<400> 27

Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asp Tyr
 1 5

<210> 28
 <211> 8

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asn Asn
1 5

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

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

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

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

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser His Leu Val
1 5

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

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

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

<400> 35

Met Gln Tyr Asp Ser Ser His Leu Val
 1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Gln Ser Tyr Asp Phe His His Leu Val
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Met Gln Tyr Asp Phe His His Leu Val
 1 5

<210> 38
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 gaggtccagt tagtggagtc tgggggaggc ctggtcaagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattctgtca tgcactgggt ccgtcaagct 120
 ccggggaagg gtctggagtg ggtttctctt gttggttggg atgggtttttt tacatactat 180
 gcagactcag tgaaggccg attcaccatc tccagagaca acgcgaagaa ctctctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacaaggg 300
 gattacatgg ggaacaactg gggccaggga accctgggtca cgtctcctc a 351

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<210> 39
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggaatctc cgggaaagac ggtgaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtgg cagcattgac agttcctatg tgcagtggta ccagcagcgc 120
 ccgggcagct cccccaccac tgtgatctat gaggatgacc aaagaccctc tgggggtccct 180
 gatcggttct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
 ctgaaaactg aggacgaggc tgactactac tgtcagtcct atgattttca tcatctggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

<210> 40
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 41
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 432

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
Página 17

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

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

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

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

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

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

<210> 43
<211> 215
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
115 120 125

Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
130 135 140

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
145 150 155 160

Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
165 170 175

Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
180 185 190

Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
195 200 205

Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 44
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

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

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

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

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

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

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

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

<210> 45
<211> 431
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Página 20

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser
 20 25 30
 Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Leu Val Gly Trp Asp Gly Phe Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asn Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn
 180 185 190
 Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 210 215 220
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 225 230 235 240
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 245 250 255

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser
1 5

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Ser Val Met His

<210> 48
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Gly Trp Asp Gly Phe Phe
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Gly Asp Tyr Met Gly Asn Asn
1 5

<210> 50
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be Asp or Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa can be Ser or Tyr

<400> 50

Xaa Xaa Val Met His
1 5

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be Leu or Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa can be Val or Ile

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be Gly or Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be Trp or Gly

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be Asp or Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be Phe, Gly or Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be Phe, Ala or Ser

<400> 51

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

Gly

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa can be Gln or Asp

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa can be Gly or Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be Asp or Ser

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be Tyr or Gly

<220>
 <221> MISC_FEATURE

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be Met, Val or Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be Gly or Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa can be Asn, Asp or Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa can be Asn, Tyr or Asp

<400> 52

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa can be Arg or Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be Ser or Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa can be Asp or Ala

<400> 53

Thr Xaa Ser Ser Gly Xaa Ile Xaa Ser Ser Tyr Val Gln
1 5 10

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be Asp or Asn

<400> 54

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

Glu Asp Xaa Gln Arg Pro Ser
1 5

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be Gln or Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa can be Ser or Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa can be Asp or Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be Phe or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be His or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa can be His or Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa can be Val or Trp

<400> 55

Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Phe Thr Phe Asp Asp Ser Val Met
1 5

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<210> 57
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57

Gly Trp Asp Gly Phe Phe
 1 5

<210> 58
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa can be any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa can be any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be any amino acid

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa can be any amino acid

<400> 58

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 59
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Glu Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val
 1 5

120726 Sequence Listing-Foreign Correspondence-

<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Phe His His Leu
1

IN THE INTERNATIONAL BUREAU

IN RE APPLICATION OF: RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/IB2011/050792

INTERNATIONAL FILING DATE: 24 February 2011 (24.02.2011)

PRIORITY DATE(S) CLAIMED: 24 February 2010 (24.02.2010) and
31 January 2011 (31.01.2011)

FOR: ANTAGONIST ANTI-IL-7 RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS

OUR REF.: PC33990A

European Patent Office
D-80298 Munich, Germany

ARTICLE 34 AMENDMENT

Sir:

Amended claims are enclosed to replace the claims currently on file. In the set of amended claims, previous claim 11 has been amended to delete the duplicate recitation of "the" in front of "antibody". Previous claim 13 has been amended to replace the recitation of "an antagonist IL-7R antibody" with "the antibody of any one of claims 1 to 9". Previous claim 14 has been amended to delete "antagonist IL-7R". Previous claim 16 has been amended to replace the recitation of "an IL-7R antagonist" with "the antibody of any one of claims 1 to 9". Previous claim 17 has been canceled. Previous claim 18 has been renumbered as claim 17 and amended to replace the recitation of "an antagonist IL-7R antibody" with "the antibody of any one of claims 1 to 9". Previous claim 19 has been canceled. Support for the amendments to the claims is found throughout the specification and claims as originally filed.

Applicants have, as required under PCT Rule 66.8(a), enclosed Substitute pages 94-96 in triplicate.

Conclusion

Favorable consideration of the amended sheets is respectfully requested.

Respectfully submitted,

Date: March 8, 2012


Susan L. Wang, Ph.D.
Agent for Applicants

Pfizer Inc.
Patent Department, 20th Floor
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755
212.733.1038

Claims

It is claimed:

- 5 1. An isolated interleukin-7 receptor (IL-7R) antibody which specifically binds to IL-7R and comprises an antigen binding region that cross-competes with a monoclonal antibody selected from the group consisting of P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a, HAL403b, C1GM and C2M3, for binding to IL-7R.
2. The antibody of claim 1, wherein the antibody binds to an epitope
10 comprising residues I82, K84, K100, T105, and Y192 of human interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α).
3. The antibody of claim 2, wherein the epitope further comprises one or more additional residues selected from the group consisting of residues D190, H191, and K194 of human IL-7R α .
- 15 4. An isolated antibody which specifically binds to interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region (VH) complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence X₁X₂VMH, wherein X₁ is D or N; X₂ is S or Y (SEQ ID NO: 50), a VH CDR2 having the amino acid sequence X₁X₂X₃X₄X₅GX₆X₇TYADSVKG, wherein X₁ is L or A; X₂ is V or I;
20 X₃ is G or S; X₄ is W or G; X₅ is D or S; X₆ is F, G or S; X₇ is F, A or S (SEQ ID NO: 51), and a VH CDR3 having the amino acid sequence X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈, wherein X₁ is Q or D; X₂ is G or I; X₃ is D or S; X₄ is Y or G; X₅ is M, V or G; X₆ is G or F; X₇ is N, D or M; X₈ is N, Y or D (SEQ ID NO: 52), a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence TX₁SSGX₂IX₃SSYVQ wherein X₁ is R or G; X₂ is S or R ; X₃ is D
25 or A (SEQ ID NO: 53), a VL CDR2 having the amino acid sequence EDX₁QRPS wherein X₁ is D or N (SEQ ID NO: 54), and a VL CDR3 having the amino acid sequence X₁X₂YX₃X₄X₅X₆LX₇ wherein X₁ is Q or M; X₂ is S or Q; X₃ is D or A; X₄ is F or S; X₅ is H or S; X₆ is H or S; X₇ is V or W (SEQ ID NO: 55), wherein the antibody blocks STAT5 phosphorylation in a STAT5 activation assay.
- 30 5. An isolated antibody which specifically binds to interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α), wherein the antibody comprises a heavy chain variable region (VH)

complementary determining region one (CDR1) having the amino acid sequence DSVMH (SEQ ID NO: 19), GFTFDDS (SEQ ID NO: 46), or GFTFDDSVMH (SEQ ID NO: 47), a VH CDR2 having the amino acid sequence LVGWDGFFTTYADSVKG (SEQ ID NO: 23) or GWDGFF (SEQ ID NO: 48), a VH CDR3 having the amino acid sequence QGDYMGNN (SEQ ID NO: 49), a light chain variable region (VL) CDR1 having the amino acid sequence TRSSGSIDSSYVQ (SEQ ID NO: 29), a VL CDR2 having the amino acid sequence EDDQRPS (SEQ ID NO: 31), and a VL CDR3 having the amino acid sequence QSYDFHHLV (SEQ ID NO: 36).

6. The antibody of claim 5, wherein the VH region comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 40 and the VL region comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 41.

7. The antibody of claim 6, wherein said antibody comprises a light chain having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 43 and a heavy chain having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 42, with or without the C-terminal lysine of SEQ ID NO: 42.

8. The antibody of any one of claims 1 to 6, wherein the antibody further comprises a constant region.

9. The antibody of claim 8, wherein the antibody is of the human IgG1 or IgG2Δa subclass.

10. A pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of claims 1 to 9.

11. A cell line that recombinantly produces the antibody of any one of claims 1 to 9.

12. A nucleic acid encoding the antibody according to any one of claims 1 to 9.

13. A method for treating and/or preventing an autoimmune disorder in an individual, the method comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1 to 9 to an individual suffering from or at risk for an autoimmune disorder, thereby ameliorating and/or preventing one or more symptoms of

the autoimmune disorder, wherein the autoimmune disorder is selected from the group consisting of type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, lupus and multiple sclerosis.

14. The method of claim 13, wherein administration of the antibody results in reduced naïve and activated T cell populations in the individual compared to before
5 administration.

15. The method of claim 14, wherein the reduced T cell populations in the individual comprise T_H1 and/or T_H17 cells.

16. A method of treating and/or preventing type 2 diabetes in an individual, the method comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody of
10 any one of claims 1 to 9 to an individual suffering from or at risk for type 2 diabetes, thereby ameliorating and/or preventing one or more symptoms of type 2 diabetes.

17. A method for treating and/or preventing graft-versus-host disease (GVHD) in an individual, comprising administering a therapeutically effective amount of the antibody of any one of claims 1 to 9 to an individual suffering from GVHD, thereby
15 ameliorating one or more symptoms of GVHD.

CAPITULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

1. Un anticuerpo del receptor de interleucina 7 (IL-7R) aislado que se une específicamente a IL-7R y comprende una región de unión a antígeno que compete de forma cruzada, con un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a, HAL403b, C1GM y C2M3, por la unión a IL-7R.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une a un epítipo que comprende los restos I82, K84, K100, T105 y Y192 del receptor de interleucina 7 alfa humano (IL-7R α).
3. El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que epítipo comprende además uno o más restos adicionales seleccionados del grupo que consiste en los restos D190, H191 y K194 de IL-7R α humano.
4. Un anticuerpo aislado que se une específicamente al receptor de interleucina 7 alfa (IL-7R α), en el que el anticuerpo comprende una región de determinación de complementariedad uno (CDR1) de una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos X₁X₂VMH, en la que X₁ es D o N; X₂ es S o Y (SEC ID N° 50), una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos X₁X₂X₃X₄X₅GX₆X₇TYADSVK_G, en la que X₁ es L o A; X₂ es V o I; X₃ es G o S; X₄ es W o G; X₅ es D o S; X₆ es F, G o S; X₇ es F, A o S (SEC ID

Nº 51), y una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, en la que X_1 es Q o D; X_2 es G o I; X_3 es D o S; X_4 es Y o G; X_5 es M, V o G; X_6 es G o F; X_7 es N, D o M; X_8 es N, Y o D (SEC ID Nº 52), una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos $TX_1SSGX_2IX_3SSYVQ$ en la que X_1 es R o G; X_2 es S o R ; X_3 es D o A (SEC ID Nº 53), una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos EDX_1QRPS en la que X_1 es D o N (SEC ID Nº 54) y una CDR3 VL que tiene la secuencia de aminoácidos $X_1X_2YX_3X_4X_5X_6LX_7$ en la que X_1 es Q o M; X_2 es S o Q; X_3 es D o A; X_4 es F o S; X_5 es H o S; X_6 es H o S; X_7 es V o W (SEC ID Nº 55), en el que el anticuerpo bloquea la fosforilación de STAT5 en un ensayo de activación de STAT5.

5. Un anticuerpo aislado que se une específicamente al receptor de interleucina 7 alfa ($IL-7R\alpha$), en el que el anticuerpo comprende una región determinante de complementariedad uno (CDR1) de región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos DSVMH (SEC ID Nº 19), GFTFDDS (SEC ID Nº 46), o GFTFDDSVMH (SEC ID Nº 47), una CDR2 VH que tiene la secuencia de aminoácidos LVGWDGFFTYADSVKG (SEC ID Nº 23) o GWDGFF (SEC ID Nº 48), una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos QGDYMGNN (SEC ID Nº 49), una CDR1 de región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos TRSSGSIDSSYVQ (SEC ID Nº 29), una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos EDDQRPS (SEC ID Nº 31) y una CDR de VL que tiene la secuencia de

aminoácidos QSYDFHHLV (SEC ID N° 36).

6. El anticuerpo de la reivindicación 5, en el que la región VH comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 40 y la región VL comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 41.

7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que dicho anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 43 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N° 42, con o sin la lisina C terminal de SEC ID N° 42.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo comprende adicionalmente una región constante.

9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es de la subclase IgG1 o IgG2Δa humana.

10. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Una línea celular que produce de forma recombinante el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

12. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

13. Un método para tratar y/o prevenir un trastorno autoinmune en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 a un individuo que padece o está en riesgo de un trastorno autoinmune, mejorando y/o previniendo de este modo uno o más síntomas del trastorno autoinmune, en el que el trastorno autoinmune se selecciona del grupo que consiste en diabetes tipo 1, artritis reumatoide, lupus y esclerosis múltiple.

14. El método de la reivindicación 13, en el que la administración del anticuerpo da como resultado poblaciones reducidas de linfocitos T vírgenes y activados en el individuo en comparación con antes de la administración.

15. El método de la reivindicación 14, en el que las poblaciones de linfocitos T reducidas en el individuo comprenden linfocitos T_H1 y/o T_H17 .

16. Un método para tratar y/o prevenir diabetes tipo 2 en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 a un individuo que padece o está en riesgo de diabetes tipo 2, mejorando y/o previniendo de este modo uno o más síntomas de diabetes tipo 2.

17. Un método para tratar y/o prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en un individuo, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 a un individuo que padece GVHD, mejorando de este modo uno o más síntomas de GVHD.

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.221 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-2	International Application No.	PCT/IB2011/050792
0-3	Applicant's or agent's file reference	PC033990A

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	72
1-2	line	24
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	ATCC American Type Culture Collection
1-3-2	Address of depositary institution	10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America
1-3-3	Date of deposit	08 February 2011 (08.02.2011)
1-3-4	Accession Number	ATCC Not Yet Available
1-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

**BUDAPEST RESTRICTED CERTIFICATE OF DEPOSIT
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE
INTERNATIONAL FORM
RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.2**

The American Type Culture Collection (ATCC®) has received your deposit of seeds/strain(s)/strain(s) in connection with the filing of an application for patent. The following information is provided to fulfill Patent Office requirements.

Dr. Wenwu Zhai
Rinat Neruroscience Corp
330 East Grand Ave
South Sanfrancisco, Ca 94080

Deposited on Behalf of: **Pfizer, Inc**

Date of Receipt of seeds/strain(s) by the ATCC®: **February 09, 2011**

<u>Identification Reference by Depositor:</u>	<u>ATCC ®Patent Deposit Designation:</u>	<u>Quantity Received:</u>
E.coli with plasmid: Human insert C1GM-VL	PTA-11678	25 vials
E.coli with plasmid: Human insert C1GM-VH	PTA-11679	25 vials

The ATCC® understands that:

1. The deposit of these seeds/strain(s) does not grant ATCC® a license, either express or implied, to infringe the patent, and our release of these seeds/strain(s) to others does not grant them a license, either express or implied, to infringe the patent.
2. If the deposit should die or be destroyed during the effective term of the patent, it shall be your responsibility to replace it with viable material. It is also your responsibility to supply a sufficient quantity for distribution for the deposit term. ATCC® will distribute and maintain the material for 30 years or 5 years following the most recent request for the deposit, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

Prior to the issuance of a U.S. Patent, the ATCC® agrees in consideration for a one-time service charge, not to distribute these seeds/strain(s) or any information relating thereto or to their deposit except as instructed by the depositor or relevant patent office. After relevant patent issues we are responsible to release the seeds/strain(s) and they will be made available for distribution to the public without any restrictions. We will inform you of requests for the seeds/strain(s) for 30 years from date of deposit.

The deposit was tested **March 03, 2011** and on that date, the seeds/strain(s) were viable
International Depository Authority: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, USA

Signature of person having authority to represent ATCC®:

ATCC® Patent Depository

March 04, 2011

Date

cc: Susan Wang

Ref: Docket or Case No: PC33990

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC033990A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2011/050792	International filing date (<i>day/month/year</i>) 24/02/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 24/02/2010
Applicant RINAT NEUROSCIENCE CORPORATION		

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 6 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 43.6**bis**(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(b), 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/IB2011/050792

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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/050792

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C12N15/13 A61K39/395 A61P37/00 A61P3/10
A61P37/06

ADD.

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)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/017468 A1 (GLAXO WELLCOME MFG PTE LTD [SG]; LEUNG STUART [CN]; LI LIXIN [CN]; LIU) 11 February 2010 (2010-02-11) page 38, line 10 - page 39, line 6; claims 1, 4-7,12,26; figure 8C; examples 2,3	1-15,19
X	CHUNG BRILE ET AL: "Prevention of graft-versus-host disease by anti IL-7R.alpha. antibody", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 8, 15 October 2007 (2007-10-15), pages 2803-2810, XP002560035, ISSN: 0006-4971, DOI: DOI:10.1182/BLOOD-2006-11-055673 [retrieved on 2007-06-26] the whole document	18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* 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 document 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

11 July 2011

Date of mailing of the international search report

21/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weikl, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/050792

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2010/085643 A1 (UNIV MIAMI [US]; BETHEA JOHN R [US]; MALEK THOMAS H [US]) 29 July 2010 (2010-07-29) paragraphs [0062], [0 87], [0088], [0221], [0222] -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/050792

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010017468	A1	11-02-2010	AR 072985 A1 06-10-2010
			AU 2009279471 A1 11-02-2010
			CA 2733432 A1 11-02-2010
			EP 2318442 A1 11-05-2011
			KR 20110044777 A 29-04-2011
			US 2010040616 A1 18-02-2010
			UY 32038 A 26-03-2010

WO 2010085643	A1	29-07-2010	NONE

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12(completely); 19(partially)

Claims relating to isolated antagonistic interleukin-7 receptor antibodies P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a, HAL403b, C1GM and C2M3; compositions comprising such antibodies; nucleic acids encoding such antibodies; therapeutic methods employing such antibodies.

2. claims: 13-15(completely); 19(partially)

claims relating to the use of antagonistic IL-7R antibodies in the treatment of autoimmune diseases

3. claims: 16, 17(completely); 19(partially)

claims relating to the use of antagonistic IL-7R antibodies in the treatment of type 2 diabetes

4. claims: 18(completely); 19(partially)

claims relating to the use of antagonistic IL-7R antibodies in the treatment of graft-versus-host disease (GVHD)
