

[0001]

Anticuerpos dirigidos contra CD127

[0002] La invención se refiere al campo de anticuerpos dirigidos contra la subunidad alfa del receptor para interleuquina 7 (IL-7), designado CD127 o p90 IL-7R o IL-7R α o IL-7R α – a veces también denominada IL-7Ra –, especialmente de la cadena alfa del receptor para IL-7 humana expresado en células humanas. Estos anticuerpos tienen propiedades antagonistas para la interacción IL-7-IL-7R, pueden presentar actividad citotóxica contra células CD127-positivas pero no aumentan la maduración de células dendríticas (CDs) inducida por TSLP, una citoquina que también usa CD127 como parte de su receptor. Alternativamente, adicionalmente, estos anticuerpos no inducen la internalización del CD127 y/o inhiben la internalización inducida por IL-7 de CD127. De acuerdo a otro aspecto de la invención se proveen anticuerpos que reconocen un epítipo del CD127 humano que comprende secuencias desde el sitio 2b de CD127, en particular el epítipo comprende secuencias de CD127 humano del dominio D1 y del sitio 2b de CD127, en particular el epítipo comprende al menos una secuencia de D1 que comprende la SEQ ID No: 115 (en particular que comprende SEQ ID No: 110) y una secuencia del sitio 2b que comprende la secuencia de SEQ ID No: 116 y opcionalmente también comprende SEQ ID No: 117 (en particular comprende SEQ ID No: 111).

[0003] En consecuencia los anticuerpos de la invención son adecuados para su uso para remediar una condición diagnosticada en un paciente humano que resulta de patogénesis relacionadas a la linfopoyesis, cuando las vías de señalización de IL-7 proveen una contribución a dichas patogénesis, especialmente cuando es indeseable un aumento en la maduración, más precisamente la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras, de las células dendríticas.

Bioquímica

[0004] El CD127 es común al receptor de IL-7 (IL-7R) y al receptor TSLP (TSLPR). El IL-7R está constituido por un heterodímero de CD127 y la cadena gamma común (γ c) de los receptores de interleuquina. La cadena gamma común γ c está denominada ocasionalmente en la presente y en la literatura como CD132. IL-7R se une a la Interleuquina 7. El receptor TSLP es un heterodímero de CD127 y el factor 2 de tipo receptor de citoquina (CRLF2, por sus siglas en inglés). El receptor de TSLP se une a TSLP. En la literatura, TSLPR se utiliza a veces para

designar tanto la cadena CRLF2 del receptor como el complejo CD127/CRLF2. Para evitar confusión, en lo que sigue TSLPR designa usualmente el complejo.

[0005] El CD127 (Swiss Prot, número de acceso P16871) puede existir en cuatro isoformas. La isoforma canónica, también denominada H20 (Swiss Prot P16871.1) es una proteína transmembrana de paso único y tiene 459 aminoácidos que consisten, desde el extremo N-terminal al C-terminal, de un péptido señal de 20 aminoácidos, un dominio extracelular de 219 aminoácidos, un dominio transmembrana de 25 aminoácidos y un dominio intracelular de 195 aminoácidos. Otras isoformas comparten la secuencia de todo (o la mayoría) del dominio extracelular de H20 y presentan variadas secuencias C-terminales. Las isoformas 2 y 4 son secretadas (Swiss Prot P16871-4 y P16871-3), mientras que la isoforma 3 (Swiss Prot P16871-2) es también una proteína transmembrana. La secuencia del CD127, sin el péptido señal, se provee en la presente como SEQ ID No: 57. Cuando se refiere a aminoácidos numerados de CD127 en la presente solicitud, dicha secuencia servirá de referencia para la numeración. Se reporta que CD127 tiene la secuencia de SEQ ID No:113, y su dominio extracelular, cuando el péptido señal es eliminado, tiene la secuencia de SEQ ID No:114. A menos que se indique lo contrario, la numeración usada en la presente para aminoácidos de CD127 es la numeración de SEQ ID No:114.

[0006] El CD127 es un Receptor de Clase I de Homología de Receptor de Citoquina (CRH I, por sus siglas en inglés). Como bien es conocido en el arte, el dominio extracelular de estos receptores consiste en dos dominios fibronectina tipo 3, denominados D1 y D2. La estructura cristalográfica precisa del CD127 ha sido publicada y discutida en por ej. McElroy et al., 2009; McElroy et al., 2012 y Walsh, 2012 y en particular ha sido divulgada como dato de estructura de proteína en la base de datos de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB), con el número de acceso 3UP1. Se considera generalmente que D1 está involucrado en la unión con IL-7, mientras que D2 está involucrado en la unión a la cadena γ_c (y también con IL-7). De manera significativa, el sitio 2b del dominio D2, que consiste esencialmente en los aminoácidos 109 a 127 de la SEQ ID No:114 (ver Walsh, 2012) es crítico para la interacción CD127- γ_c , en particular para permitir o aumentar la unión de CD127 con γ_c en presencia de IL-7. En particular, se cree que las mutaciones en P112 y L115, que han sido identificadas en pacientes que sufren de Inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por sus siglas en inglés), desestabilizan el núcleo hidrofóbico del dominio D2 que da por resultado probablemente su característica patogénica. Como se dijo anteriormente, el sitio 2b consiste esencialmente en los aminoácidos 109 a 127; el experto apreciará que los extremos de tal dominio pueden no necesariamente estar definidas inequívocamente con precisión de una base y que puede entenderse que el sitio 2b comprende, en uno o ambos extremos de la secuencia mencionada, 1, 2, o 3 aminoácidos más o menos. Por lo tanto, cuando en la

presente se hace referencia al sitio 2b del CD127, esto debe entenderse que se hace referencia a una secuencia del CD127 que comienza en la posición 106, 107, 108, 109, 110, 111 o 112 y que termina en la posición 124, 125, 126 o 127; en particular a una secuencia tal que se cree o se ha demostrado constituye un sitio de unión esencial con la cadena γ c del IL-7R, en particular en presencia de IL-7.

[0007] **Señalización del IL-7R.** La unión de IL-7 a IL-7R dispara la activación de varias vías de señalización, que incluyen las quinasas Janus (JAK) 1 y 3, el transductor de señales y activador de transcripción 5 (STAT5) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-k, por sus siglas en inglés). Se ha reportado que las rutas STAT1 y STAT3 son activadas, aunque no parecen ser las rutas principales. La activación de la ruta STAT5 es requerida para la inducción de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la prevención de la entrada de la proteína pro-apoptótica Bax en la mitocondria y por lo tanto para la supervivencia de precursores de células T en desarrollo en el timo. La activación de la ruta PI3-k da por resultado la fosforilación y la retención citoplasmática de la proteína pro-apoptótica Bad.

[0008] **Señalización del TSLPR.** La Linfopoyetina Estromal Tímica, (TSLP, por sus siglas en inglés) es una citoquina epitelial que es activa en la linfopoyesis y en particular está involucrada en la regulación del desarrollo de células del sistema inmune, impactando dicha regulación en particular en la maduración de dichas células. La TSLP humana (Genbank, número de acceso AF338732) es un factor que ejerce polarización de las células dendríticas y promueve la proliferación y diferenciación de células T y B. La TSLP también suprime la generación de células Treg (Lei et al., 2011) .

[0009] Se ha demostrado que las rutas de señalización inducidas por TSLP son diferentes, a nivel molecular, de las rutas inducidas por IL-7. En particular, mientras que la unión de TSLP a su receptor también activa Jak-1, no activa Jak-3 pero activa Jak-2. Estas diferencias son consistentes con la observación de que Jak-1 se asocia con CD127, compartida por ambos receptores mientras que Jak-2 se asocia con CRLF2 y Jak-3 con γ c (Rochman et al., 2010). La activación de la ruta STAT5 se reporta también para la señalización inducida por TSLP (Zhong et al., 2014). Un efecto principal de la TSLP es conducir a la activación de células dendríticas, induciendo la sobreexpresión de moléculas co-estimuladoras tal como CD80, por lo tanto promoviendo repuestas inflamatorias mediadas por TH-2 (Reche et al., 2001).

Biología celular

[0010] “Células CD127-positivas” designa células que expresan CD127 en su superficie. En la mayoría de los casos, las células CD127-positivas expresan CD127 en un complejo que forma el IL-7R (células IL-7R-positivas) y/o en un complejo que forma el TSLPR (células TSLPR-positivas). CD127 es expresado por varias células, incluyendo ambas células T de memoria y

naive. CD127 es en particular expresado por células T efectoras (Teff), incluyendo células T en reposo y de memoria, y por células B inmaduras, pero especialmente no es expresado por células T regulatorias naturales en reposo (Treg natural). IL-7R α es esencial para promover la diferenciación de timocitos y la expansión clonal de linfocitos.

[0011] La importancia de la ruta IL-7-CD127 para la homeostasis de células T naive está resaltada por varios estudios recientes que muestran que los niveles de expresión de IL-7R α ligado a membrana en células T CD4⁺ convencionales se correlaciona con frecuencias de células T CD4⁺ emigrantes recientes del timo (RTE, por sus siglas en inglés) en individuos sanos y en pacientes infectados con HIV así como en pacientes con MS (Albuquerque et al., 2007) (Broux et al., 2010). IL-7R α es también una componente del receptor TSLP. Se ha demostrado que la secreción de TSLP por los corpúsculos de Hassall, estructuras compuestas de células epiteliales en la médula del timo, condiciona a las células dendríticas mieloides CD11c⁺ (MCDs, por sus siglas en inglés) a inducir la diferenciación de timocitos en Treg (Watanabe et al., 2005a). En consecuencia, se requieren señales del receptor de IL-7 para el desarrollo de Treg como se muestra en ratones *knockout* para IL-7R α (Mazzucchelli et al., 2008). En Haas et al., 2011, los autores mostraron una expresión reducida de IL-7R α en células T convencionales y niveles plasmáticos de IL-7 regulados hacia arriba junto con reducción de frecuencia de T-reg emigrantes recientes del timo y función Treg en MS, sin influencia genética clara (Haas et al., 2011).

[0012] El discernimiento de cómo IL-7 regula el tráfico de membrana de su receptor cognato es crucial para el entendimiento en profundidad del rol de IL-7/IL-7R en la función linfocitaria. Estudios previos han sugerido que la estimulación de células T por IL-7 conduce a la modulación negativa en superficie de CD127 dentro de los 30 minutos, posiblemente a causa de la internalización del receptor. En puntos temporales posteriores (2-6 horas), se ha mostrado que IL-7 induce regulación transcripcional negativa de CD127. Sin embargo, quedan por establecerse la dinámica exacta de internalización de CD127 y la regulación de mecanismos de tráfico por IL-7 (Henriques et al., 2010). Se ha sugerido también que la señalización inducida por IL-7 es dependiente de la internalización de CD127 y que la degradación posterior del receptor depende de la actividad de JAK3 y es mediada tanto por proteasomas como por lisosomas.

Fisiopatología

[0013] Las células dendríticas expresan altos niveles de moléculas co-estimuladoras luego de la maduración, tal como CD80, que promueve las respuestas inmunes mediadas por células T. También producen la citoquina TARC (CCL17), que induce quimiotaxis en células T. De este modo, las células dendríticas maduras contribuyen a la fisiopatología de varias enfermedades

mediadas por inmunidad donde están en juego respuestas de las células T, por ejemplo en asma, artritis reumatoide, colitis, esclerosis múltiple y uveitis. Las células dendríticas maduras también juegan un rol clave en el proceso de rechazo de células, tejidos o aloinjertos de órganos. Por lo tanto muchas estrategias terapéuticas apuntan a prevenir la maduración de células dendríticas.

[0014] La presencia o ausencia de moléculas co-estimuladoras en células presentadoras de antígeno (APCs, por sus siglas en inglés), tal como células dendríticas, influencia significativamente la naturaleza cualitativa y cuantitativa de una respuesta inmune. La sobreexpresión de CD80 por células dendríticas causa maduración de CDs y aumenta la activación de células T de memoria (Bour-Jordan et al., 2011). Mecánicamente, la interacción de CD28 con CD80 ocupa el clúster central de la sinapsis inmunológica y está co-localizada con el TCR vinculado, estabilizando así la sinapsis inmune (Dustin y Shaw, 1999) (Grakoui et al., 1999). La interacción entre CD28 y CD80 en efecto genera el espaciado apropiado para que TCR interactúe eficientemente con moléculas HLA (Shaw y Dustin, 1997).

[0015] La esclerosis múltiple (MS, por sus siglas en inglés) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central (SNC). La aparición de parches desmielinizados en el SNC de pacientes con MS está asociada con un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente de macrófagos y linfocitos T. A nivel mecanicista, la MS está considerada como una enfermedad autoinmune. La MS está típicamente considerada como una enfermedad mediada principalmente por células T CD4+. Subconjuntos particulares de CD4+: Th1 y más recientemente Th17, fueron implicados en la patofisiología de la enfermedad. De momento, sigue siendo difícil asignar roles específicos a cada subpoblación Th1 y Th17. Además, la inhibición del tráfico de leucocitos por antagonismo de la integrina alfa4 ($\alpha 4$) ha sido ahora validada como un enfoque terapéutico válido para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tal como MS y como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés) y también para el tratamiento de aterosclerosis (Zhi et al., 2014). $\alpha 4\beta 7$ está expresada en un conjunto más restringido de leucocitos que incluye macrófagos activados, subconjuntos de linfocitos, células NK, mastocitos y eosinófilos.

[0016] La IL-7 humana induce una fuerte expresión de las integrinas $\alpha 4$ y $\beta 7$ *in vitro* en linfocitos T humanos y aumenta drásticamente la frecuencia de linfocitos T humanos que expresan las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4\beta 7$ (Figura 19), que se necesitan para el alojamiento y la retención de los linfocitos en tejidos no linfoides tal como intestino, cerebro y piel (Denucci et al., 2009; Gorfu et al., 2009).

[0017] Las células T naive son parcialmente responsables del rechazo agudo de órganos y tejidos trasplantados. Estas células pueden ser controladas por drogas inmunosupresoras actuales (inhibidores de calcineurina) y por anticuerpos monoclonales que bloquean la co-

estimulación (anti-adhesión, inhibidores CD80/86). Las células T de memoria son también responsables del rechazo de trasplantes. Las células T de memoria se acumulan en el hombre debido a la historia inmune adquirida, principalmente reacciones previas contra virus. Se ha mostrado que las células T de memoria pueden ser reactivadas por aloantígenos como resultado de la “inmunidad heteróloga”, que es la reacción cruzada de nuestras defensas antivirales con aloantígenos (Adams et al., 2003). La inmunidad heteróloga representa una barrera potente a la inducción de tolerancia dado que las células T de memoria, en contraste con las células T naive, están programadas para activarse rápidamente, con un requerimiento reducido de señales co-estimuladoras. Las células T de memoria pueden también estar involucradas en el rechazo crónico. Además de su rol en trasplante de órganos y tejidos, las células T naive y de memoria son también co-responsables de muchas enfermedades autoinmunes. Este es el caso de la colitis ulcerativa (Shinohara et al., 2011), de la artritis reumatoide, de la psoriasis o de la enfermedad injerto contra hospedante.

[0018] Además, se ha demostrado que varias células cancerosas presentan IL-7R. Este es el caso para el linfoma cutáneo de Sezary (60% de ellos), o leucemia linfoblástica aguda infantil en la cual alrededor del 15% de los casos desarrollan mutaciones de ganancia de función en CD127, convirtiendo a estos tumores en parcialmente dependientes de IL-7 (Shochat et al., 2011).

[0019] El agotamiento de linfocitos T ha sido un enfoque inmunosupresivo obvio para contrarrestar el rechazo al aloinjerto o para combatir la autoinmunidad. Sin embargo, el agotamiento total de células T puede no ser favorable para la inducción de tolerancia inmunológica. Hacer diana en subpoblaciones de células T o células T selectivamente activadas, sin modificar células Treg, puede constituir un enfoque pro-tolerogénico (Haudebourg et al., 2009). CD127 puede por lo tanto ser visto como una potencial diana terapéutica atractiva para anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos a modular respuestas inmunes dado que tales anticuerpos monoclonales pueden tener el potencial de agotar linfocitos efectores pero no regulatorios. Se ha asumido en consecuencia que pueden mostrar eficacia en trasplantes, autoinmunidad (Michel et al., 2008) y cáncer por acceso antagonizante de IL-7 a IL-7-R y así limitar la función y el crecimiento de las células T y B.

[0020] Una terapia con un anticuerpo monoclonal contra células CD127⁺ que interfiere con la ruta de IL-7 puede cumplir ese objetivo eliminando/neutralizando células T naive y de memoria y/o reduciendo su número mientras que preserva células Treg o eliminando o reduciendo el número de células cancerosas CD127-positivas. Una terapia con un anticuerpo monoclonal contra células CD127⁺ puede sin embargo actuar como una espada de doble filo si lleva a la activación de células dendríticas. En efecto, CD127 es también expresado por células dendríticas en asociación con CRLF2, formando el receptor TSLP. En presencia de TSLP, las

células dendríticas se activan y promueven respuestas inmunes mediadas por células T. Algunos anticuerpos monoclonales contra CD127, presumiblemente modificando la forma en que TSLP interactúa con el receptor TSLP, tienen la propiedad de aumentar la maduración de células dendríticas inducida por TSLP (como se muestra en la Figura 7 con la condición medio). Como consecuencia, una terapia con un anticuerpo monoclonal contra CD127 que no aumente la maduración de células dendríticas inducida por TSLP presentaría una ventaja terapéutica. Presentaría el beneficio del bloqueo de IL-7R sin la desventaja de activar células dendríticas en un ambiente inflamado que contenga TSLP.

[0021] En una publicación (Racapé et al., 2009) los autores analizaron el interés del receptor alfa de IL-7 (IL-7R α) como un potencial diana terapéutica en trasplantes. Habiendo revisado la expresión de IL-7R α en varias células T y células que responden a IL-7, los autores analizaron si hacer diana en células T de memoria que expresan IL-7R α podría prolongar la supervivencia del aloinjerto en ratones y concluyeron que hacer diana en IL-7 o IL-7R α podría salvar ventajosamente células Treg. Entre las perspectivas, los autores señalaron que hacer diana ya sea en IL-7 o en IL-7R α en tratamiento terapéutico podría tener diferentes consecuencias en la supervivencia de las células que expresan CD127 y podría desencadenar diferentes tipos de linfopenia. La cuestión de los efectos de anticuerpos que estarían dirigidos contra IL-7R α dependiendo de si fueran anticuerpos bloqueantes o neutralizantes o citotóxicos también se postuló desde un punto de vista conceptual. Los autores sin embargo no mostraron haber obtenido y ensayado tales anticuerpos y más bien expresaron la necesidad de estudios posteriores para evaluar la relevancia de la hipótesis.

[0022] En vista de las desventajas de los enfoques terapéuticos disponibles en enfermedades relacionadas al sistema inmune y otras enfermedades que involucran IL-7/IL-7R α tales como diferentes tipos de cáncer, incluyendo algunos cánceres de mama, sigue habiendo una necesidad de drogas adicionales, especialmente para candidatos activos con respecto a dianas más selectivas para el propósito de controlar por ej. modular la activación inmune en pacientes humanos.

[0023] En este contexto, anticuerpos monoclonales contra IL-7R α que tienen propiedades antagonistas hacia IL-7R α han sido divulgados en WO 2010/017468 y sus versiones humanizadas en WO 2011/094259 en vista a tratar enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple. Se dice que los anticuerpos descritos son antagonistas de IL-7 que se unen a su receptor, y activos contra células de expansión y supervivencia T_H17 y T_H1 que se decía necesitaban interacción de IL-7 con su receptor CD127. El efecto de estos anticuerpos en la maduración de células inmunes, y particularmente de células dendríticas, no ha sido considerado. Además, se dice que estos anticuerpos no inhiben la producción de TARC inducida por TSLP (p.107 de WO 2011/094259). Similarmente, anticuerpos anti-CD127

reportados en WO 2011/104687 o en WO 2013/056984, que son contemplados para uso en el tratamiento de diabetes, lupus, artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes, no han sido discutidos con respecto a su posible efecto en la maduración de células dendríticas y no ha sido reportada su interacción con la señalización inducida por TSLP. Además, como han publicado Kern et al (Kern et al., 2013; Kern et al., 2015) y como se muestra en la presente, los anticuerpos anti-CD127 del arte previo inducen la internalización del receptor. Como los anticuerpos antagonistas anti-CD127 que también inducen la internalización de CD127 fallan en controlar la hipersensibilidad cutánea tipo IV (Figura 10), mientras que anticuerpos antagonistas anti-CD127 que no inducen la internalización sí lo hacen, podría ser que el proceso de internalización active la ruta de señalización, mitigando el efecto antagonista de los anticuerpos. Por último, los anticuerpos del arte previo reconocen un epítipo que no comprende ninguna secuencia del sitio 2b de CD127 (es decir en particular de los aminoácidos 109-127 de SEQ ID No:114); y no se ha mostrado que interrumpen la unión de CD127 con la cadena γ c del IL-7R.

[0024] A pesar del interés reciente en el desarrollo de anticuerpos para CD127, los esfuerzos se han por lo tanto concentrado en la inhibición de la señalización IL-7R inducida por IL-7. Sin embargo, se ha involucrado a TSLP y a TSLPR en un número de patologías. Se ha mostrado que TSLP juega un rol en enfermedades de la piel y pulmones (He y Geha, 2010) y se lo asocia con varias patologías incluyendo la enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias y la dermatitis atópica en humanos y ratones (Ying et al., 2008) (Jariwala et al., 2011). Se ha mostrado además que TSLP se asocia a la regulación de la inmunidad y la inflamación intestinal (Taylor et al., 2009). Otras patologías que involucran a TSLP y al TSLPR incluyen la leucemia pediátrica de células B (van Bodegom et al., 2012), trastornos alérgicos específicos de los pulmones y la piel, enfermedades relacionadas a la autoinmunidad (Roan et al., 2012) y cáncer, incluyendo cáncer de mama (Olkhanud et al., 2011).

[0025] Por lo tanto, mientras está ampliamente reconocido en el arte previo que los anticuerpos anti-CD127 son candidatos prometedores para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad a través del antagonismo de los mecanismos inducidos por IL-7 y/o mediados por IL-7-R, y que tales anticuerpos también se unirían a CD127 en el contexto del receptor TSLP e interferirían con los mecanismos inducidos por TSLP y/o mediados por el receptor de TSLP, su posible participación en la maduración de células dendríticas no fue cuestionada y nunca fue sugerido en el arte previo la mejora que consiste en obtener anticuerpos que no presenten el efecto de aumentar la maduración de células dendríticas y/o que no induzcan la internalización de CD127 y/o que inhiban la internalización inducida por IL-7.

[0026] A continuación de su sorprendente descubrimiento del aumento indeseado inducido por anticuerpos anti-CD127 existentes en la maduración de células dendríticas inducida por TSLP

(aunque los anticuerpos inhiben la producción de TARC inducida por TSLP), los inventores han desarrollado anticuerpos que no presentan tal aumento y son así más adecuados para el tratamiento de enfermedades, en particular de enfermedades autoinmunes. Más aún, los inventores han descubierto que anticuerpos que no inducen la internalización y/o inhiben la internalización de CD127 inducida por IL-7 tienen alta eficiencia, especialmente *in vivo* comparados con anticuerpos del arte previo tal como MD707-13.

[0027] La invención provee medios apropiados en este contexto, que se refieren a anticuerpos monoclonales contra IL-7R α que interfieren sólo negativamente con la ruta TSLP. En consecuencia los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la invención no aumentan la maduración de células dendríticas inducida por TSLP, contrariamente a lo que observaron los inventores con anticuerpos anti-CD127 convencionales. Además o alternativamente, los anticuerpos de la invención no inducen la internalización de CD127 y/o inhiben la internalización de CD127 inducida por IL-7. En una forma de realización particular, los anticuerpos provistos en la invención combinan estas propiedades de maduración de CD y/o relacionadas con la internalización con actividad antagonista hacia la señalización IL-7/IL-7-R. En formas de realización particulares, los anticuerpos de la invención inhiben la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ inducida por IL-7 en células T, en particular *in vivo*. Estos mAbs con mecanismos de acción novedosos constituyen por lo tanto productos nuevos para evaluar los beneficios terapéuticos de hacer diana en CD127.

[0028] Además, los inventores divulgan el epítipo reconocido por un anticuerpo preferido de la invención, permitiendo así el desarrollo directo de anticuerpos alternativos y/o fragmentos o dominios de unión a antígeno de los mismos o dominios de unión a antígeno estructuralmente relacionados a partir de otros tipos de polipéptidos, que se unen al epítipo relevante y preservan las características deseadas.

[0029] Epítopos de CD127 reconocidos por N13B2 fueron identificados por relevamiento de oligo-péptidos basado en arreglos (*arrays*), (a veces llamado relevamiento de péptido superpuestos o análisis *pepscan*) y comprenden las secuencias de aminoácidos de CD127 humano que consiste en las secuencias de ep1 (SEQ ID No: 110), ep2 (SEQ ID No: 111) y ep3 (SEQ ID No:86). Esta técnica usa una biblioteca de secuencias de oligo-péptidos a partir de segmentos que se superponen y que no se superponen de una proteína diana y evalúa su habilidad de unirse al anticuerpo de interés. Combinando secuencias de péptido no adyacentes de diferentes partes de la proteína diana y forzando la rigidez conformacional de este péptido combinado (tal como usando andamiajes CLIPS) (Timmerman et al., 2007), epítopos discontinuos pueden ser mapeados con muy alta confiabilidad y precisión (Cragg, 2011) (Gaseitsiwe et al., 2010). La determinación adicional del epítipo, usando procedimientos de protección contra proteólisis, permitió determinar que el epítipo conformacional comprende

las secuencias de aminoácidos de CD127 humano que tiene las secuencias de SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 y SEQ ID No: 117. El epítipo por lo tanto comprende secuencias del sitio 2b de CD127. Además, el epítipo comprende secuencias en ambos dominios D1 y D2 de CD127 y más específicamente secuencias del dominio D1 junto con secuencias del sitio 2b. Epítopos de acuerdo con la invención son descritos en más detalle a continuación. En particular, dichos epítopos consisten en SEQ ID No:115 (o SEQ ID No:110), SEQ ID No:116 (o SEQ ID No:86) y SEQ ID No:117 (o SEQ ID No:111) en su arreglo conformacional en el CD127 nativo.

[0030] En una forma de realización particular, los anticuerpos monoclonales también ejercen una acción citotóxica contra células diana CD127+ que también reduce físicamente su número (contracción de la subpoblación).

[0031] La invención concierne así a una macromolécula, tal como un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o una molécula quimérica que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo, que (i) se une específicamente la cadena alfa del receptor de IL-7 (designado CD127) a través de la interacción anticuerpo-antígeno, especialmente de la cadena alfa del receptor de IL-7 expresado por células humanas CD127-positivas, y que (ii) no aumenta la maduración inducida por TSLP de células dendríticas (caracterizada por ej. por la expresión aumentada de antígenos de superficie celular CD80 y/o CD40) y/o (iii) no induce la internalización de CD127 y/o inhibe la internalización de CD127 inducida por IL-7.

[0032] En una forma de realización particular de la invención, dicha macromolécula comprende una cadena VH que comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- VHCDR1 SEQ ID No:10;
- VHCDR2 SEQ ID No:12;
- VHCDR3 SEQ ID No:14 o SEQ ID No: 48;
- VH SEQ ID No:22

y/o una cadena VL que comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- VLCDR1 SEQ ID No:16 o SEQ ID No: 50;
- VLCDR2 SEQ ID No:18 o SEQ ID No: 52;
- VLCDR3 SEQ ID No:20;
- VL SEQ ID No:24.

[0033] En formas de realización particulares, la macromolécula exhibe actividad citotóxica contra células T humanas que expresan CD127 (células CD127+). En otras formas de realización, la macromolécula no exhibe actividad citotóxica contra células T humanas que expresan CD127 (células CD127+).

[0034] La invención también concierne composiciones que comprenden dicha macromolécula, métodos para obtener dichas macromoléculas y usos de dichas macromoléculas y composiciones.

[0035] Como se utiliza en la presente, una macromolécula designa cualquier molécula, especialmente una molécula de origen biológico o una molécula que comprende fragmentos de origen biológico, que tiene un peso molecular de más de 500 Da. Las macromoléculas incluyen, pero no están limitadas a, polipéptidos y polipéptidos modificados tales como polipéptidos glicosilados y conjugados de los mismos. Como se usa en la presente, una macromolécula que “se une específicamente a CD127 a través de interacciones anticuerpo-antígeno” significa que las interacciones entre dicha macromolécula y CD127 consisten esencialmente en las mismas interacciones que aquellas entre un anticuerpo específico para CD127 y CD127. En particular, dicha macromolécula puede comprender los residuos del anticuerpo que están involucrados en dicha interacción, en una configuración espacial que permite la formación de las mismas uniones químicas con la proteína CD127. En una forma de realización particular, la macromolécula comprende al menos una secuencia CDR de una cadena VH y/o de una cadena VL de un anticuerpo. En una forma de realización preferida, la macromolécula comprende todas las secuencias de CDR de la cadena VH y/o de la cadena VL de un anticuerpo. En una forma de realización preferida, la macromolécula comprende la cadena VH completa y/o la cadena VL completa de un anticuerpo.

[0036] En formas de realización particulares, la macromolécula es producida, diseñada o seleccionada para reconocer un epítipo definido como sigue (definido por al menos una de las siguientes características):

(a) el epítipo comprende secuencias, en particular al menos 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos consecutivos, tomados del sitio 2b de CD127, en particular de los aminoácidos 109-127 de SEQ ID No:114, más particularmente de los aminoácidos 110-125, 110-120, 112-120 de SEQ ID No:114, más particularmente de los aminoácidos 114-119 de SEQ ID No:114 (que corresponde a SEQ ID No:116); en particular, el epítipo comprende SEQ ID No:116, en particular comprende SEQ ID No:86; en particular, el epítipo comprende P112 o L115 de CD127;

(b) además de las características (a) anteriores, el epítipo comprende secuencias, en particular al menos 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos consecutivos, tomados del dominio D1 de CD127, en particular de los aminoácidos 1-98 de SEQ ID No:114; en particular, el epítipo comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID No:115 (en particular comprende la secuencia de aminoácidos de ep1 (SEQ ID No:110);

(c) además de las características de (a), y opcionalmente de (b) anteriores, el epítipo comprende secuencias, en particular 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos consecutivos, tomados de los aminoácidos 180-220 de SEQ ID No:114, en particular de los aminoácidos 190 a 200; en particular el epítipo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No:117; en particular comprende la secuencia de aminoácidos de ep2 (SEQ ID No:111);

(d) el epítipo comprende las secuencias de SEQ ID No:115 y las secuencias de SEQ ID No:116, o el epítipo comprende la secuencia de SEQ ID No:117 y las secuencias de SEQ ID No:116; en particular el epítipo comprende las secuencias de SEQ ID No:115, SEQ ID No:116 y SEQ ID No:117;

(e) el epítipo comprende secuencias de CD127 como se definen en (a), (b) (c) y/o (d) anteriormente, y ninguna otra secuencia de aminoácidos (de más de 3, 4, o 5 aminoácidos consecutivos) de CD127 que las explícitamente mencionadas, es decir en particular, el epítipo comprende sólo las siguientes secuencias de CD127:

- una secuencia tomada del sitio 2b, en particular que consiste de los aminoácidos 109-127 de SEQ ID No:114, o los aminoácidos 110-125, 110-120, o 112-120 de SEQ ID No:114, o los aminoácidos 114-119 de SEQ ID No:114 (que corresponde a SEQ ID No:116), o la secuencia que corresponde a SEQ ID No:86, y/o que consiste en una secuencia de 3 aminoácidos o más que 3, 4, 5, 6, 7 aminoácidos y en 19 aminoácidos o menos que 19, 18, 15, 11 aminoácidos tomados del sitio 2b, en particular una secuencia tal que comprende P112 o L115 de CD127;

- opcionalmente, además de la secuencia del sitio 2b, una secuencia tomada del dominio D1 de CD127, en particular de los aminoácidos 98 de SEQ ID No:114, en particular una secuencia que consiste en SEQ ID No:110 o en SEQ ID No:115, y/o que consiste en una secuencia de 3 aminoácidos o más de 3, 4, 5, 6, 7 aminoácidos y de 20 aminoácidos o menos que 20, 18, 16, 11 aminoácidos que comprende SEQ ID No:115 o comprendida en la secuencia SEQ ID No:115;

- opcionalmente, además de la secuencia del sitio 2b y de la secuencia opcional del dominio D1 si está presente, una secuencia tomada de los aminoácidos 180 a 220 de SEQ ID No:114; en particular una secuencia que consiste en SEQ ID No:111 o de SEQ ID No:117, y/o que consiste en una secuencia of 3 aminoácidos o más de 3, 4, 5, 6, 7 aminoácidos y de 20 aminoácidos o menos que 20, 18, 16, 11 aminoácidos que comprende SEQ ID No:117 o comprendida en la secuencia de SEQ ID No:117;

donde dicho epítipo comprende posiblemente aminoácidos adicionales, siempre que estos aminoácidos adicionales no sean tomados de la secuencia de CD127 (es decir siempre que el epítipo no comprenda más que 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos de la

secuencia de CD127 aparte de la secuencia del sitio 2b y posiblemente las secuencias opcionales del dominio D1 y proveniente de los aminoácidos 180-220 de SEQ ID No:114 descritas anteriormente);

(f) el epítipo, además de las características descritas en (a), (b), (c) o (d) anteriormente, no comprende más que 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos tomados de la región 99-108 de SEQ ID No:114, no comprende más que 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos tomados de la región 128-179 de SEQ ID No:114 y/o no comprende más que 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos de la región 220-239 de SEQ ID No:114, en particular no comprende más que 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos de cualquier región 99-108, 128-179 y 220-239 de SEQ ID No:114;

(g) el epítipo comprende la combinación de secuencias de CD127 definidas en (a), (b), (c), (d), (e) y/o (f) anteriormente, en donde algunos aminoácidos han sido mutados, en particular delecionados y/o sustituidos, en particular sustituidos por un aminoácido con propiedades similares (sustituciones conservativas); en particular, el epítipo consiste en, o comprende, secuencias que tienen al menos 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con las secuencias de CD127 como se define en (a), (b), (c), (d), (e) y/o (f) anteriormente, en combinación como se define en (b), (c) o (d) donde sea relevante;

(h) el epítipo es un epítipo conformacional que tiene las características definidas en (a), (b), (c), (d), (e), (f) y/o (g) anteriormente, es decir comprende o consiste en las secuencias como se define en (a), (b), (c), (d), (e), (f) y/o (g) anteriormente en una conformación que imite la conformación de dichas secuencias dentro del CD127 nativo (ya sea como un monómero o como un dímero con γ C y/o asociado con IL-7);

(i) el epítipo comprende un fragmento de CD127 (es decir un tramo de aminoácidos consecutivos) con las características de (a), (b), (c), (d), (g) y/o (h) anteriores;

(j) el epítipo tiene las características definidas en (g) anteriormente y se obtiene mediante una tecnología tal como la tecnología CLIPS que permite la síntesis de ensamblajes de péptidos con estructura predecible.

[0037] En formas de realización particulares de epítipos con las características de (b) y (c), el epítipo incluye la secuencia de aminoácidos de CD127 que está intercalada entre las dos secuencias ep1 y ep2, y opcionalmente no se extienden para incluir cualquiera, o no se extienden para incluir más de un aminoácido de la secuencia de CD127 humano aguas arriba (es decir del extremo N-terminal de la secuencia de ep1) y/o aguas abajo (es decir del extremo C-terminal de la secuencia de ep2) de estas secuencias. En otras formas de realización particulares, el epítipo es tal que ninguna de las secuencias de ep1 o ep2 se extiende para incluir ninguno de sus aminoácidos adyacentes en la secuencia de CD127 humano, o para incluir más de 7, 5 o 1 aminoácidos consecutivos de sus aminoácidos adyacentes en la

secuencia de CD127 humano que está intercalada entre ep1 y ep2; la extensión de las secuencias ep1 y ep2 puede en este caso estar también limitada aguas arriba (de ep1) o aguas abajo (de ep2) como antes. En formas de realización particulares, las secuencias de CD127 que comprenden las secuencias epítipo anteriores no se extienden para comprender sus aminoácidos adyacentes de la secuencia del CD127 humano por más de 1 aminoácido N-terminal o por más de 7 aminoácidos C-terminales adyacentes a ep1, o por más de 30 aminoácidos N-terminales o 30 aminoácidos C-terminales adyacentes a ep2.

[0038] En formas de realización donde la macromolécula es producida, diseñada o seleccionada para reconocer un epítipo que comprende varias secuencias no contiguas de aminoácidos de CD127 (es decir secuencias que no son contiguas en la secuencia primaria de CD127), es posible producir o seleccionar anticuerpos que reconozcan un epítipo que comprende una de dichas secuencias de CD127, y luego seleccionar entre estos anticuerpos aquellos que reconozcan la(s) otra(s) secuencia(s) de CD127 (dicha posterior selección puede ser también realizada por sucesivas selecciones si más de dos secuencias no adyacentes de CD127 deben ser reconocidas).

[0039] La presente invención también incluye el epítipo conformacional reconocido por los anticuerpos antagonistas de la invención. La presente invención también incluye anticuerpos que se unen a este epítipo conformacional. Las formas de realización incluyen un epítipo conformacional de CD127 que comprende (i) el dominio que tiene al menos 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 115 y/o el dominio que tiene al menos 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 117 y (ii) el dominio que tiene al menos 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 116. Más particularmente, el epítipo conformacional de CD127 que comprende los residuos de aminoácido 73-79 y/o 114-119 y los residuos aminoácidos 193-196 de SEQ ID No:114. La presente invención incluye anticuerpos que se unen a este epítipo conformacional. En formas de realización particulares, la macromolécula es producida, diseñada o seleccionada para reconocer un epítipo conformacional que comprende las secuencias de aminoácidos de CD127 humano que tienen las secuencias de SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 y SEQ ID No: 117.

[0040] En particular, en las formas de realización anteriores, el anticuerpo se genera contra un inmunógeno que consiste en, o comprende, un epítipo como se describió, es decir es inicialmente producido por inmunización de un animal que no es un humano, en particular un mamífero, con un antígeno que comprende o que consiste en dicho epítipo. En consecuencia, la invención también se refiere a un antígeno del cual el epítipo es como se ha descrito anteriormente, en particular a su uso como un inmunógeno en la producción de anticuerpos y/o a su uso en la selección y/o métodos de ensayo para producir un anticuerpo o fragmento de

unión a antígeno u otra macromolécula. La invención se relaciona también con dichos métodos que usan dicho antígeno. Como los antígenos pueden comprender constituyentes no peptídicos además de constituyentes peptídicos y/o pueden comprender constituyentes peptídicos que no forman parte del epítipo, debe entenderse en la presente que, a menos que se declare de otra forma u sea obvio a partir del contexto, cuando se refiere a la secuencia de un antígeno y/o a las características de dicha secuencia, debe entenderse que dicha secuencia o características designa la secuencia (o características de la misma) del epítipo parte del antígeno. Si el antígeno comprende aminoácidos que no forman parte del epítipo, dichos aminoácidos preferiblemente no comprenden más de 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos de CD127.

[0041] En consecuencia y a menos que parezca técnicamente irrelevante, las definiciones y características divulgadas en la presente con respecto a los anticuerpos o sus fragmentos se aplican de manera similar a cualquier macromolécula de la invención.

Unión a CD127

[0042] De acuerdo con la invención, “*unirse*” a la proteína IL-7R α se refiere a una interacción de tipo antígeno-anticuerpo y abarca propiedades “específicas de *unión*” de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos cuya unión específica significa que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se unen a la proteína IL-7R α mientras que no se unen o se unen con una afinidad significativamente menor a otras proteínas (por ej. la cadena γ y del receptor común de citoquinas). La unión específica se define y/o determina preferiblemente en condiciones fisiológicas, especialmente en términos de pH y contenido de sales de la solución de prueba. La unión y la especificidad de unión pueden ser evaluadas de acuerdo con las pruebas divulgadas en los Ejemplos y en particular pueden ser evaluadas por Biacore, ELISA, o análisis Western Blot.

[0043] En una forma de realización particular de la invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tienen diana y se unen a la cadena alfa IL-7-R cuando está formando complejo con el receptor TSLP (con CCRF2; Genbank, número de acceso AF338733; Reche et al., 2001).

[0044] En una forma de realización particular, los anticuerpos o fragmentos de los mismos o moléculas quiméricas de la invención se unen a CD127 como una proteína aislada con una constante de disociación (Kd) menor que 5E-10 M. En una forma de realización preferida, la constante de disociación (Kd) es menor que 1E-10 M o menor que 9E-11 M, o menor que 5E-11 M.

[0045] En formas de realización particulares, los anticuerpos o fragmentos de los mismos o la molécula quimérica u otra macromolécula de la invención se une a un antígeno de CD127 humano que comprende las secuencias de ep1 (SEQ ID No: 110) y/o ep2 (SEQ ID No: 111). En formas de realización particulares, el antígeno comprende un fragmento de CD127 humano que comprende ambas ep1 y ep2 (es decir el antígeno comprende las secuencias de ep1 y ep2 y las secuencias intercaladas de CD127 humano). En otras formas de realización, el antígeno comprende sólo las secuencias ep1 y ep2 de CD127 humano, posiblemente además de otras secuencias de otro origen, que son distintas de la secuencias de CD127. En aún otras formas de realización, las secuencias ep1 y/o ep2 se extienden para incluir unos pocos aminoácidos adicionales de CD127 humano, en particular hasta un aminoácido N-terminal para ep1, hasta 7 aminoácidos C-terminales para ep1, hasta 1, 10, 20 o 30 aminoácidos N-terminales para ep2, hasta 7; 10, 20 o 30 aminoácidos C-terminales para ep2. Antígenos particulares incluyen: un antígeno como antes, que comprende preferiblemente ambos ep1 y ep2, en donde la secuencia de CD127 que comprende ep1 no se extiende para comprender los aminoácidos adyacentes a dicha secuencia en la secuencia de CD127 humano, o no se extiende para comprender más de 1 aminoácido N-terminal o más de 7 aminoácidos C-terminales de ep1 en la secuencia de CD127 humano; y un antígeno como anteriormente en donde la secuencia de CD127 que comprende ep2 no se extiende para comprender los aminoácidos adyacentes a dicha secuencia en la secuencia de CD127 humano, o no se extiende para comprender más de 30 aminoácidos N-terminales o más de 30 aminoácidos C-terminales de ep2 en la secuencia de CD127 humano; y antígenos que tienen ambas de estas características. En formas de realización particulares, los anticuerpos o fragmentos de los mismos o moléculas quiméricas u otra macromolécula de la invención se unen a un antígeno de CD127 humano que comprende las secuencias de SEQ ID No: 115, SEQ ID No: 116 y SEQ ID No: 117.

[0046] En algunas formas de realización, el antígeno no se superpone con, o no comprende, un epítipo de IL-7R que es reconocido por un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en C1GM, C2M3, P3A9, P4B3, P2D2, P2E11, HAL403a y HAL403b (descritos en WO 2011104687 A1). En algunas formas de realización, el anticuerpo se genera contra un antígeno o se une a un epítipo que no comprende cualquier, o no comprende algunos de los residuos I82, K84, K100, T105, y Y192 del receptor alfa de interleuquina 7, en particular no comprende K100 y/o no comprende T105. En algunas formas de realización, el antígeno o epítipo no comprende K194, o no comprende alguno, o no comprende ninguno, de los residuos seleccionados del grupo que consiste en los residuos D190, H191, y K194 de IL-7R humano. En formas de realización particulares, el antígeno o epítipo no comprende I82 ni K84, o no comprende K100 ni T105, o no comprende Y192, o no comprende D190, H191, Y192 ni K194.

[0047] Mientras que CD127 es común a ambos el IL-7R y el TSLPR, debe notarse que un anticuerpo anti-CD127 no necesariamente reconocerá (es decir se unirá en condiciones adecuadas) a CD127 en ambos contextos. Más aún, incluso si el anticuerpo se une a CD127 tanto en el contexto de IL-7R como de TSLPR, no necesariamente tendrá el mismo efecto en la interacción IL-7-IL-7R y la interacción TSLP-TSLPR. Podría, por ejemplo, evitar la unión de IL-7 a IL-7R y no la unión de TSLP a TSLPR. Además, la unión del anticuerpo a cualquier receptor puede tener diferentes efectos, más allá de los diferentes efectos en la interacción ligando-receptor. En efecto, la unión del anticuerpo podría modificar la conformación del receptor, independientemente del ligando o en combinación con el ligando, y así activar o inactivar el receptor. El efecto puede ser diferente para cada receptor y puede en realidad ser invertido: un anticuerpo que inactiva el IL-7R puede activar el TSLPR, y viceversa.

[0048] Como se usa en la presente, activar un receptor significa disparar al menos algunos de los cambios bioquímicos que ocurren en la unión del ligando a su receptor. Esos cambios pueden incluir la modificación de la estructura del receptor (por ej. dimerización); fosforilación del receptor y reclutamiento y/o fosforilación de proteínas unidas al receptor (tales como quinasas Janus, factores de transcripción STAT etc) y/o cambios en la localización celular del receptor (por ej. internalización del receptor). Como se usa en la presente, desactivar un receptor significa evitar, o revertir, al menos algunas de las modificaciones bioquímicas asociadas a la unión de su ligando al receptor. Por ejemplo, un receptor puede estar constitutivamente activado (es decir activado aún en ausencia de un ligando) y desactivado en presencia de un agente tal como el anticuerpo de la invención. Alternativamente, o adicionalmente, la activación inducida por ligando puede ser completamente, o parcialmente, inhibida al desactivar el receptor. La desactivación puede por lo tanto ocurrir, entre otros mecanismos, evitando la unión del ligando (y posteriores eventos de “activación”), y/o evitando cambios estructurales asociados con la unión del ligando (por ej. dimerización) y/o modificación de la ubicación celular del receptor (por ej. el agente desactivador puede disparar la internalización y/o degradación del receptor y así prevenir la activación por el ligando).

Ausencia de maduración de células dendríticas inducida por TSLP aumentada

[0049] Los anticuerpos de la invención pueden unirse a CD127 en el receptor TSLP (es decir pueden unirse a CD127 cuando éste está en un complejo con el CRLF2, formando el receptor TSLP). Por lo tanto, los anticuerpos de la invención pueden interferir con la señalización inducida por TSLP y/o mediada por el receptor TSLP.

[0050] Los inventores han encontrado sorprendentemente que anticuerpos existentes dirigidos contra (o que reconocen) CD127 en el receptor TSLP y que presentan algún antagonismo con la interacción TSLP-TSLPR, sin embargo, aumentan la maduración de células dendríticas

inducida por TSLP: dicha maduración es más alta en células tratadas con TSLP y los anticuerpos, que en células tratadas sólo con TSLP. Estos anticuerpos convencionales aumentan la maduración de células dendríticas dependiente de TSLP. En formas de realización preferidas, los anticuerpos o fragmentos de la invención no establecen sinergia con TSLP para la maduración de células inmunes, en particular células dendríticas. En otras palabras, los anticuerpos de la invención no aumentan la maduración de células inmunes inducida por TSLP. Este efecto es particularmente deseado en la maduración de células dendríticas.

[0051] Debe enfatizarse que la capacidad de los anticuerpos anti-CD127 de inhibir la producción de TARC inducida por TSLP no puede ser considerada como un predictor válido de un efecto negativo (o al menos no positivo) de los anticuerpos en la señalización inducida por TSLP y sus consecuencias aguas abajo (en particular la maduración de células dendríticas). En efecto, como los inventores han descubierto, aún los anticuerpos que inhiben eficientemente la producción de TARC inducida por TSLP pueden aumentar la maduración de células dendríticas dependiente de TSLP medida por la expresión de CD40 o CD80 con el TSLPR.

[0052] La maduración de células dendríticas inducida por TSLP puede ser medida por la expresión del marcador celular CD40 y/o CD80 (Inaba et al., 1995; Watanabe et al., 2005b) como un marcador que es un determinante de la maduración de algunas células inmunes, especialmente de la llamada diferenciación TH-2 observada en algunas enfermedades autoinmunes, asma y trasplantes. En formas de realización particulares, el aumento en la maduración de células dendríticas inducida por TSLP se evalúa determinando una expresión elevada del(de los) marcador(es) de superficie celular CD40 y/o CD80 en células TSLPR-positivas tratadas con TSLP y con la macromolécula de la invención comparadas con células TSLPR-positivas tratadas sólo con TSLP.

[0053] En una forma de realización particular, las macromoléculas, en particular los anticuerpos o fragmentos de los mismos, que no aumentan la maduración de células dendríticas inducida por TSLP no aumentan la expresión de CD80 en más de 25% cuando en comparación con la estimulación sólo con TSLP (sin macromolécula). Preferiblemente, la expresión de CD80 no aumenta en más de 20%, preferiblemente no más de 10% y aún más preferiblemente no más de 5%. En una forma de realización preferida particular, la expresión de CD80 no aumenta o disminuye en células estimuladas con TSLP y con la macromolécula, en comparación con células estimuladas sólo con TSLP.

[0054] En una forma de realización particular, las macromoléculas que no aumentan la maduración de células dendríticas inducida por TSLP no aumentan la expresión de CD40 en más de 50% cuando se compara con estimulación con TSLP sola (sin macromolécula).

Preferiblemente, la expresión de CD40 no es incrementada en más de 25%, preferiblemente no más de 10% y aún más preferiblemente no más de 5%. En una forma de realización particular preferida, la expresión de CD40 no aumenta o disminuye en células estimuladas con TSLP y con la macromolécula cuando se compara con células estimuladas con TSLP sola.

[0055] La medición de la maduración de células dendríticas se ilustra también en los ejemplos (ver en particular Ejemplo 9) y puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquier método estándar conocido por el experto, en particular cualquier método adecuado para determinar la expresión de CD80 y/o CD40 en células dendríticas, como un marcador de maduración de células dendríticas.

[0056] Para evaluar las propiedades de los anticuerpos anti-CD127 con respecto a la ausencia de potenciación de señalización TSLP indeseada, pueden ser usadas células que expresan el TSLPR, tal como células de mamífero pro B (tal como células as BA/F3 ilustradas en la presente).

Inhibición de la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ inducida por IL-7

[0057] En formas de realización particulares, los anticuerpos (o macromoléculas) de la invención inhiben la expresión *in vitro* de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ inducida por IL-7. La expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ inducida por IL-7, como se usa en la presente, designa uno o ambos del aumento en el nivel de expresión de las integrinas $\alpha 4$ y $\beta 7$ y del aumento en el número o proporción de linfocitos T que expresan las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$. La inhibición puede ser parcial, es decir el nivel de expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ en presencia de IL-7 aumenta por sobre el nivel basal (es decir el nivel sin anticuerpo ni IL-7) en presencia de anticuerpos, pero menos que en ausencia de anticuerpos; o la inhibición puede ser completa, es decir el nivel de expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ en presencia de IL-7 y del anticuerpo no es más alto que el nivel basal.

[0058] En formas de realización particulares, los anticuerpos de la invención inhiben la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$ *in vitro*, es decir el nivel de expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$ es menor en células tratadas con anticuerpos (y con IL-7 y/o sin IL-7) que en células no tratadas (es decir sin anticuerpo o IL-7). El alcance de la inhibición puede ser dependiente de la dosis. La inhibición de la expresión puede ser medida como se expone en la sección de Ejemplos, que el experto puede adaptar por ej. a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo o dominios de unión a antígeno específicos u otras macromoléculas divulgadas en la presente y/o a modelos específicos de enfermedad cuando sea necesario.

[0059] En formas de realización preferidas, los anticuerpos (o macromoléculas) de la invención inhiben la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$ *in vivo*. Como se usa en la presente,

esta expresión significa que (i) la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$, (ii) el número y/o la proporción de $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o de linfocitos T $\alpha 4/\beta 7$ -positivos y/o (iii) el injerto de $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o de linfocitos T $\alpha 4/\beta 7$ -positivos se reducen en muestras obtenidas de animales tratados con anticuerpos con respecto a animales no tratados. Como se usa en la presente, injerto designa la incorporación de tejido injertado o células dentro del cuerpo del hospedante, un proceso que típicamente ocurre en un período de tiempo de unas pocas horas a unos pocos días. En formas de realización particulares, el animal es un mamífero, en particular un mamífero no humano, especialmente un ratón. En formas de realización particulares, el animal es un humano. En formas de realización particulares, el efecto es observado en linfocitos humanos inyectados en un receptor animal, preferiblemente un ratón inmunodeficiente. En formas de realización particulares, dos semanas luego de la inyección de PBMC humanas en ratones inmunodeficientes, el porcentaje promedio de células T integrina $\beta 7$ -positivas se reduce en al menos 25%, preferiblemente en al menos 50%, en ratones tratados con anticuerpo en relación con ratones no tratados. En formas de realización particulares, dos semanas después de la inyección de PBMC humanas en ratones inmunodeficientes, el porcentaje promedio de células T de injerto integrina $\beta 7$ -positivas se reduce en al menos 25%, preferiblemente en al menos 50%, y aún más preferiblemente en al menos 70% en ratones tratados con anticuerpo en relación con ratones no tratados. El efecto del anticuerpo o macromolécula de la invención puede ser determinado usando los métodos expuestos en la sección de Ejemplos, en particular el Ejemplo 16 para la expresión de las integrinas $\alpha 4/\beta 7$ y el injerto, que el experto puede adaptar cuando sea necesario por ej. al anticuerpo, fragmento o dominio de unión a antígeno del mismo específicos u otra macromolécula y/o a un modelo específico de enfermedad.

Inhibidores de la internalización de CD127

[0060] La internalización es el proceso celular por el cual un receptor de la superficie celular tal como CD127 es transportado dentro del espacio citoplasmático celular (posiblemente en la superficie de compartimentos o membranas intracelulares) y así no es accesible desde el espacio extracelular, es decir el receptor internalizado no puede ser directamente contactado por un ligando en el espacio extracelular. Un ligando, ya sea un ligando natural del receptor o cualquier ligando artificial u otra molécula unida al receptor, puede ser internalizado junto con el receptor. La mayoría de los receptores están sometidos a internalización constante y su expresión en la superficie celular se mantiene constante ya sea a través del reemplazo de receptores internalizados y degradados por nuevos receptores sintetizados/maduros o a través del reciclado directo, es decir transporte del receptor internalizado de vuelta a la superficie celular.

[0061] Algunos estímulos pueden llevar a una tasa aumentada de internalización y/o a una tasa disminuida de reemplazo/reciclado, llevando así a una disminución neta de la expresión del receptor en la superficie celular. Como se usa en la presente, la internalización de CD127 inducida por IL-7 designa la disminución de la expresión en la superficie celular de CD127 inducida por la presencia de IL-7 (u observada en presencia de IL-7) en el medio extracelular, como se ha observado *in vitro* luego de un tiempo limitado de incubación para excluir efectos a más largo plazo tal como regulación transcripcional negativa. Dicho tiempo limitado es típicamente del orden de decenas de minutos, preferiblemente menos de 2 horas, más preferiblemente menos de 1 hora y aún más preferiblemente 45 minutos o menos, 30 minutos o menos, 15 minutos o menos.

[0062] En una forma de realización preferida, el anticuerpo de la invención inhibe la internalización de CD127 inducida por IL-7. Así, cuando están incubadas con el anticuerpo de la invención, la presencia de IL-7 no induce disminución de la expresión de CD127 en la superficie celular, o induce una disminución menos fuerte de la expresión de CD127 en la superficie celular que en las células incubadas sin anticuerpos. En formas de realización particulares, cuando están incubadas con anticuerpos de la invención, el nivel de expresión de CD127 en la superficie celular cuando las células están incubadas a 37°C durante 15 minutos con 5 ng/mL de IL-7 es al menos 80%, preferiblemente al menos 90% del nivel de expresión en la superficie celular en células incubadas sin IL-7. *In vitro*, la expresión en la superficie celular es preferiblemente medida luego de un tiempo limitado como se ha indicado anteriormente. Además, como la mayoría de los procesos de internalización celular son inhibidos a baja temperatura, el efecto se observa mejor usualmente a temperatura fisiológica, en particular 37°C. Sin embargo, se contempla también incubar las células a baja temperatura, en particular 4°C.

[0063] Se sabe que los anticuerpos contra un receptor pueden inducir internalización del receptor, lo que significa que la expresión del receptor en la superficie celular está disminuida en presencia del anticuerpo. Esto puede surgir en particular al inducir un cambio en la conformación del receptor que imita la inducida por el ligando natural, inductor de internalización, y este efecto puede depender del epítipo reconocido por los anticuerpos. Como se usa en la presente, “un anticuerpo induce la internalización de CD127” significa que células incubadas en presencia de un anticuerpo presentan expresión disminuida de CD127 en la superficie celular comparadas con células incubadas en ausencia del anticuerpo. La expresión en la superficie celular es preferentemente medida *in vitro* luego de un tiempo de incubación limitado y en condiciones de temperatura como las mencionadas anteriormente. En una forma de realización preferida, el anticuerpo de la invención no induce la internalización de CD127. Así, la expresión en la superficie celular de CD127 en células incubadas en presencia

del anticuerpo no está reducida, o no está significativamente reducida, con respecto a la expresión en la superficie celular en células incubadas en condiciones de otra forma idénticas, pero en ausencia del anticuerpo. En formas de realización particulares, cuando son incubadas a 37°C durante 30 a 45 minutos en presencia de 50 ng/mL de anticuerpo, el nivel de expresión en la superficie celular de CD127 es al menos 80%, preferiblemente al menos 90% de su nivel en células incubadas en ausencia del anticuerpo. Este efecto puede ser observado en ausencia de IL-7 (en ambas células tratadas con anticuerpo y no tratadas), en presencia de IL-7, y/o ambos.

[0064] Cualquiera de las dos características relacionadas a la internalización de CD127 descritas anteriormente (es decir inhibición de internalización inducida por IL-7 o no inducción de internalización) pueden contribuir a una eficiencia aumentada de los anticuerpos, mientras que la combinación de ambas características es posiblemente aún más eficiente. Se divulga en la presente un anticuerpo que representa una forma de realización preferida, en donde en presencia de ambos IL-7 y dicho anticuerpo, la expresión en la superficie celular de CD127 no está significativamente disminuida. En tales formas de realización preferidas, luego de 45 minutos de incubación en presencia de 50 ng/mL de anticuerpo, que incluye 15 minutos en presencia de 5 ng/mL de IL-7, a 37°C, el nivel de expresión en la superficie celular de CD127 es al menos 80%, preferiblemente al menos 90% de su nivel en células control, incubadas en medio que no contiene anticuerpo o IL-7.

Interrupción de la interacción CD127 - cadena γ c

[0065] De acuerdo con una forma de realización particular, la macromolécula de la invención, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la mismo, puede interrumpir la unión de CD127 a la cadena γ c del IL-7R. Esto significa que, en condiciones (en particular condiciones químicas y físicas) donde CD127 y la cadena γ c están unidos entre sí en ausencia del anticuerpo, y en particular en presencia de IL-7, la presencia del anticuerpo reduce significativamente dicha unión. En formas de realización particulares, en presencia del anticuerpo y de IL-7, CD127 no se une a γ c. En particular, en presencia del anticuerpo y de IL-7, la cantidad hallada de cadena γ c asociada con (o unida a) CD127 es menor que 80%, preferiblemente menor que 50%, aún más preferiblemente menor que 25% o 10% de la cantidad unida en ausencia del anticuerpo (o en presencia de otro anticuerpo anti CD-127 tal como MD707-13) en condiciones de otra manera idénticas, en particular en presencia de IL-7. Tal característica del anticuerpo puede ser evaluada en particular por métodos de co-inmunoprecipitación, bien conocidos por el experto para probar la interacción de proteínas, e ilustrados en la presente en el Ejemplo 21. En particular, las células pueden ser incubadas en presencia o en ausencia del anticuerpo que está siendo evaluado, luego solubilizadas en

condiciones que permiten la preservación de complejos de proteínas, y el lisado resultante puede estar sometido a una inmunoprecipitación anti-CD127 y la presencia de γc en el complejo inmunoprecipitado que contiene CD127 evaluada por análisis Western Blot usando anticuerpos anti- γc (de manera opuesta, la inmunoprecipitación puede ser realizada usando anticuerpos anti- γc y la presencia de CD127 evaluada usando anticuerpos anti-CD127).

[0066] Un método para obtener tales anticuerpos es generar dichos anticuerpos contra un epítipo que comprende secuencias del sitio 2b de CD127, o seleccionar anticuerpos que reconozcan tal epítipo. En efecto, la unión del anticuerpo a este sitio, crítica para la interacción con γc , es probable que interrumpa, por ej. por competición o impedimento estérico, la interacción de γc con CD127.

[0067] Es también posible, en particular, seleccionar anticuerpos que tienen esta característica deseable, a partir de anticuerpos anti-CD127, por ej. a partir de una biblioteca de anticuerpos (incluyendo cuando esta biblioteca no fue obtenida usando un inmunógeno que comprende secuencias del sitio 2b), a través de procedimientos de relevamiento estándar conocidos por el experto y fácilmente adaptables para tal fin. En particular, por ejemplo, CD127 (o su dominio extracelular solo) puede unirse a placas de 96 pocillos o sustratos similares comúnmente usados para tal relevamiento. Los anticuerpos que constituyen la biblioteca pueden agregarse individualmente, cada uno en un pocillo, y la cadena γc puede ser agregada a cada pocillo. Luego de lavar las placas, la presencia de γc en cada pocillo puede comprobada, por ej. por métodos basado en fluorescencia. En pocillos que contienen un anticuerpo con la característica deseada, no se detectará γc (o se detectarán pequeñas cantidades de la misma). Es obviamente posible modificar este procedimiento, por ej. para detectar en cambio los anticuerpos en un sustrato sólido en lugares individuales; permitir que CD127 se una a los anticuerpos detectados, y permitir que la cadena γc se una a las cadenas CD127 así inmovilizadas.

Antagonista hacia la interacción IL-7-IL-7R

[0068] De acuerdo con una forma de realización particular, una macromolécula de la invención, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene además propiedades antagonistas hacia la interleuquina 7 (IL-7) y por ende antagoniza el acceso, es decir la unión de IL-7 a CD127 en células CD127-positivas.

[0069] "*Propiedades antagonistas hacia la interacción IL-7-IL-7R*" significa que anticuerpos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que tienen diana en la IL-7R α , tienen el efecto de impedir la accesibilidad del receptor IL-7 expresado en células, especialmente células T efectoras humanas, en particular células T de memoria humanas, a su

compañero de unión IL-7, especialmente IL-7 humana. Como resultado de antagonizar la unión de IL-7, los anticuerpos de la invención o sus fragmentos funcionales conducen a linfopenia al prevenir la generación dependiente de IL-7 de células T del timo.

[0070] Las propiedades antagonistas pueden ser en particular antagonismo hacia señalización de IL-7R inducida por IL-7. Un antagonista de la señalización de IL-7R inducida por IL-7 puede identificarse midiendo la inhibición de la fosforilación de STAT5 como se describe en los Ejemplos. La fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 es un marcador de la activación de IL-7R y se espera que un anticuerpo que antagonice la interacción IL-7-IL-7R disminuya la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7.

[0071] En formas de realización particulares, la macromolécula de la invención es un antagonista de la señalización IL-7R inducida por IL-7. En una forma de realización particular, la macromolécula de la invención inhibe la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7. En formas de realización preferidas, la inhibición de la fosforilación de STAT5 es mayor que 50% a concentraciones de anticuerpo tan bajas como 50 ng/ml y/o la inhibición de la fosforilación de STAT5 es mayor que 80% a concentraciones de anticuerpo tan bajas como 100 ng/ml. La Inhibición de la fosforilación de STAT5 puede evaluarse por métodos conocidos por el experto y en particular por el método expuesto en la sección de ejemplos (en particular Ejemplo 3).

“Antagonista para la unión de TSLP”

[0072] Dado que los anticuerpos de la invención se unen a CD127 en el IL-7R, pueden también unirse a CD127 en el TSLPR y, particularmente por impedimento estérico y/o por competición por sitios de unión comunes, pueden inhibir la unión de TSLP al TSLPR. En otras palabras, los anticuerpos de la invención pueden presentar actividad antagonista para la unión de TSLP.

“Inhibidor de la producción de TARC inducida por TSLP”

[0073] En una forma de realización particular, los anticuerpos de la invención pueden inhibir la producción de TARC inducida por TSLP de células CD127-positivas. Como se menciona anteriormente, las células dendríticas estimuladas con TSLP producen niveles elevados de TARC. Esto puede resultar de su unión al TSLPR y su potencial acción como antagonistas de la unión de TSLP.

[0074] En una forma de realización particular, los anticuerpos de la invención, y sus fragmentos de unión a antígeno han sido seleccionados por su capacidad de no aumentar su maduración (maduración que es por ej. determinada como expresión aumentada del marcador de superficie celular CD40 y/o CD80).

[0075] El nivel de producción de TARC inducido por TSLP puede ser más bajo en células tratadas con TSLP junto con los anticuerpos anti-CD127 o fragmentos de los mismos o moléculas quiméricas como se describe en la presente que en células tratadas sólo con TSLP. En otras palabras, las macromoléculas de la invención pueden ser inhibidores de la producción de TARC inducida por TSLP. En una forma de realización de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo o molécula quimérica como se describe en la presente disminuye los niveles de producción de TARC. En una forma de realización particular de la invención, el nivel de producción de TARC en células tratadas con TSLP y el anticuerpo, fragmento o molécula quimérica se reduce en más de 10%, preferiblemente más de 20%, comparado con el nivel en células tratadas sólo con TSLP, a concentraciones de anticuerpo tan bajas como 1 µg/ml. Mediciones de la producción de TARC se ilustran en los ejemplos (en particular Ejemplo 9) y pueden llevarse a cabo en células inmunes CD127-positivas, en particular células dendríticas, de una muestra de sangre usando cualquier método estándar conocido por el experto.

“Actividad citotóxica”

[0076] En una forma de realización particular de la invención, los anticuerpos de la invención o sus fragmentos de unión a antígeno dirigidos contra la molécula CD127 presente en el receptor de IL-7 tienen además la propiedad de ser citotóxicos contra células humanas, especialmente células T humanas que expresan dicho receptor. Las células humanas que expresan CD127 como una cadena del receptor de IL-7, que son la diana de los anticuerpos de la invención y fragmentos de los mismos, son principalmente linfocitos T y más precisamente son subpoblaciones de linfocitos T efectoras que incluyen células T naïve y de memoria pero no son células T regulatorias (Treg), especialmente no son Treg en reposo naturales. Las células T de memoria son generadas como resultado de cebado de antígeno y principalmente definidas por sus características funcionales, que incluyen la capacidad de experimentar proliferación de recuerdo tras reactivación y diferenciación en células efectoras secundarias y de memoria. De manera similar, el receptor TSLP diana (como un complejo que incluye la cadena alfa IL-7-R) regula linfocitos T *helper*, células B y la diferenciación de células dendríticas.

[0077] De acuerdo con una forma de realización de la invención, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que tienen “*actividad citotóxica contra células T*” o propiedades citotóxicas (anticuerpos citotóxicos) producen agotamiento de la población de células T efectoras matando estas células y en consecuencia reducen el número de estas células cuando son administrados. Por el contrario, estos anticuerpos no alteran la subpoblación de células T reguladoras o no la alteran con un alcance significativo, permitiendo que las células Treg realicen su función. En este contexto, en una forma de realización

particular, se ha observado que la proporción de células T reguladoras (Treg) versus T efectoras (Teff) aumenta luego de la administración de anticuerpos de la invención. En una forma de realización particular, los anticuerpos de la invención permiten aumentar dicha proporción hasta aproximadamente 10% o más. En una forma de realización particular, el aumento en la proporción de Treg versus Teff es de aproximadamente 20%.

[0078] De acuerdo con una forma de realización particular de la invención, los anticuerpos citotóxicos muestran Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). De acuerdo con otra forma de realización, los anticuerpos de la invención no tienen propiedades ADCC. El potencial ADCC del anticuerpo se consideró positivo cuando la citotoxicidad específica fue superior a 10%. Las propiedades ADCC pueden ser evaluadas en una prueba ADCC tal como la prueba descrita en los Ejemplos (en particular el Ejemplo 10). Cuando el anticuerpo es un anticuerpo de rata las células efectoras utilizadas en el ensayo ADCC son células LAK (por sus siglas en inglés) (asesinas activadas por linfoquinas) de rata. Cuando los anticuerpos están humanizados el ensayo ADCC puede ser llevado a cabo en células humanas NK.

[0079] Los anticuerpos de la invención que tienen tanto propiedades citotóxicas como antagonistas para células CD127-positivas permiten efectos acumulativos de estas propiedades con respecto al agotamiento de células T efectoras, especialmente de células T de memoria, permitiendo así un agotamiento más fuerte (agotamiento de la reserva de células CD127+) y una correspondiente reducción en el número de células T diana.

[0080] Los párrafos anteriores así como los Ejemplos describen cómo evaluar estas características funcionales. Las secciones siguientes detallarán varias características estructurales y posibles modificaciones de los anticuerpos o fragmentos o moléculas quiméricas. A la luz de esta guía, el experto podrá obtener anticuerpos o fragmentos que tienen las características estructurales a continuación junto con las características funcionales deseadas, en particular empezando por un anticuerpo que tiene las características funcionales deseadas, tal como N13B2, porque en algunos casos puede predecirse que adoptar alguna de las características estructurales no modificará las características funcionales y/o evaluando la pérdida de características funcionales luego de la introducción de una nueva característica estructural. Además, con la divulgación en la presente del epítipo reconocido por el anticuerpo, el desarrollo de otros anticuerpos que compartan las mismas características funcionales es un procedimiento de rutina, dado que anticuerpos generados contra el mismo o un epítipo similar podrían ser seleccionados por su capacidad para provocar efectos similares al unirse a CD127. Nuevamente, siguiendo directamente los procedimientos de prueba que son divulgados en la presente, el experto puede usar estas pruebas para seleccionar anticuerpos adecuados.

[0081] En una forma de realización preferida de la invención, la macromolécula es N13B2 o un anticuerpo que tiene al menos una de las CDRs de N13B2, o los fragmentos son fragmentos de N13B2. En consecuencia, la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo cuya VH comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos, o una de las variantes humanizadas preferibles descritas a continuación:

- VHCDR1 SEQ ID No:10;
- VHCDR2 SEQ ID No:12;
- VHCDR3 SEQ ID No:14;

[0082] y/o cuya VL comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos, o una de las variantes humanizadas preferibles descritas a continuación:

- VLCDR1 SEQ ID No:16;
- VLCDR2 SEQ ID No:18;
- VLCDR3 SEQ ID No:20.

[0083] En una forma de realización particular, la macromolécula comprende al menos 2, 3, 4 o 5 de las secuencias de CDR de N13B2 es decir VHCDR1 SEQ ID No:10, VHCDR2 SEQ ID No:12, VHCDR3 SEQ ID No:14, VLCDR1 SEQ ID No:16, VLCDR2 SEQ ID No:18 y VLCDR3 SEQ ID No:20, cualquier número de las cuales puede ser reemplazada por una de sus variantes humanizadas preferibles descritas a continuación. En una forma de realización particular, la macromolécula comprende las seis secuencias de CDR de N13B2, cualquier número de las cuales puede ser reemplazado por una de sus variantes humanizadas preferibles descritas a continuación. En formas de realización particulares, la macromolécula comprende la cadena VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No:22 y/o la cadena VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No:24. En formas de realización particulares, la macromolécula comprende la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No:2 y/o de SEQ ID No:6 y/o la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No:4. Otras formas de realización particulares relativas a las cadenas VH y VL son variantes humanizadas divulgadas a continuación. En una forma de realización particular, la cadena constante tiene la secuencia de la cadena Fc de IgG1 de rata de la Figura 12 (Uniprot P20759) y/o la secuencia de SEQ ID No:34.

Fragmentos

[0084] Un “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo de la invención es una parte del anticuerpo, es decir una molécula que corresponde a una porción de la estructura del anticuerpo de la invención que exhibe capacidad de unión a antígeno para la cadena alfa del receptor IL-7 para IL-7 humana, posiblemente en su forma nativa; tal fragmento especialmente

exhibe la misma o sustancialmente la misma especificidad de unión a antígeno para dicho antígeno comparada con la especificidad de unión a antígeno del correspondiente anticuerpo de cuatro cadenas. Ventajosamente, los fragmentos de unión a antígeno tienen una afinidad de unión similar a la de los anticuerpos de 4 cadenas correspondientes. Sin embargo, los fragmentos de unión a antígeno que tienen una afinidad de unión a antígeno reducida con respecto a los anticuerpos de 4 cadenas están también comprendidos dentro de la invención. La capacidad de unión a antígeno puede determinarse midiendo la afinidad del anticuerpo y del fragmento considerado. Estos fragmentos de unión a antígeno pueden designarse también como fragmentos funcionales de anticuerpos.

[0085] Fragmentos de un anticuerpo de unión a antígeno son fragmentos que comprenden sus dominios hipervariables designados como CDRs (por su siglas en inglés, Regiones Determinantes de la Complementariedad) o parte(s) del mismo que abarcan el sitio de reconocimiento para el antígeno, es decir, IL-7Ra de IL-7 humana, definiendo así especificidad de reconocimiento a antígeno. Cada cadena Liviana y Pesada (respectivamente VL y VH) de una inmunoglobulina de cuatro cadenas tiene tres CDRs, designadas VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 y VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, respectivamente. Así la invención se refiere en particular a fragmentos de anticuerpos de la invención, que comprenden o consisten en todos o una selección de CDRs entre VL-CDR1 (SEQ ID No:16), VL-CDR2 (SEQ ID No:18), VL-CDR3 (SEQ ID No:20) y VH-CDR1 (SEQ ID No:10), VH-CDR2 (SEQ ID No:12) y VH-CDR3 (SEQ ID No:14), sus variantes humanizadas divulgadas a continuación, o porciones funcionales de las mismas, es decir porciones que exhiben la especificidad de unión deseada preferiblemente con una alta afinidad para IL-7Ra de IL-7 humana.

[0086] Fragmentos particulares de unión a antígeno de la invención son fragmentos de la cadena VH de un anticuerpo de la invención que combinan sus dominios CDR1, CDR2 y CDR3, en particular aquellos que tienen la secuencia de aminoácidos divulgada en la presente, que incluyen las variantes humanizadas divulgadas a continuación. Otros fragmentos de la invención son fragmentos de la cadena VL de un anticuerpo de la invención que combinan sus dominios CDR1, CDR2 y CDR3, en particular aquellos que tienen la secuencia de aminoácidos divulgada en la presente, incluyendo las variantes humanizadas descritas a continuación. Los fragmentos que comprenden o consisten en VH-CDR3 y/o VL-CDR3, en particular aquellos que tienen la secuencia de aminoácidos divulgada en la presente, incluyendo las variantes humanizadas divulgadas a continuación, o porciones funcionales de los mismos, son especialmente preferidos cuando las regiones CDR3 parecen ser determinantes en la especificidad de reconocimiento al antígeno.

[0087] El experto será capaz de determinar la ubicación de las varias regiones/dominios de anticuerpos en referencia a las definiciones estándar establecidas en este sentido, que incluyen

un sistema de referencia de numeración (Martin, 2001) o en referencia al sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., 1992) o por aplicación del algoritmo “*collier de perle*” de IMGT (<http://www.imgt.org/IMGTindex/Colliers.html>, Lefranc et al., 1999). Al respecto, para la definición de las secuencias de la invención, se hace notar que la delimitación de las regiones/dominios puede variar de un sistema de referencia a otro. En consecuencia, las regiones/dominios como se definen en la presente invención comprenden secuencias que muestran variaciones en longitud o localización de las secuencias involucradas dentro del largo completo de la secuencia de los dominios variables de los anticuerpos, de aproximadamente $\pm 10\%$.

[0088] Además, residuos de desinmunización pueden estar presentes en los dominios variables CDR de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En una forma de realización particular, el anticuerpo o fragmento del mismo está desinmunizado.

[0089] Basados en la estructura de inmunoglobulinas de cuatro cadenas, los fragmentos de unión a antígeno pueden por lo tanto definirse por comparación con secuencias de anticuerpos en las bases de datos disponibles y en el arte previo (Martin, 2001), y especialmente por comparación de la ubicación de los dominios funcionales en estas secuencias, observando que las posiciones de los dominios de estructura y constantes están bien definidas para varias clases de anticuerpos, especialmente para IgGs, en particular IgGs de mamíferos. Tal comparación también involucra datos relacionados a la estructura tridimensional de los anticuerpos.

[0090] Para propósitos ilustrativos de formas de realización específicas de la invención, los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo que contiene los dominios variables que contienen las CDRs de dicho anticuerpo incluyen Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ que están bien definidos con referencia a (Kabat et al., 1992), (Martin, 2001) y también (Delves et al., 2011). Los fragmentos Fv consisten en los dominios VL y VH de un anticuerpo asociados entre sí por interacciones hidrofóbicas; en fragmentos dsFv, el heterodímero VH:VL está estabilizado por un enlace disulfuro; en fragmentos scFv, los dominios VL y VH están conectados entre sí a través de un enlazador peptídico flexible que forma así una proteína de cadena única. Los fragmentos Fab son fragmentos monoméricos obtenibles por digestión con papaína de un anticuerpo; comprenden la cadena L completa, y un fragmento VH-CH1 de la cadena H, unidos entre sí a través de un enlace disulfuro. El fragmento F(ab')₂ puede ser producido por digestión con pepsina de un anticuerpo por debajo de la bisagra disulfuro; comprende dos fragmentos Fab', y adicionalmente una porción de la región bisagra de la molécula de inmunoglobulina. Los fragmentos Fab' son obtenibles a partir de fragmentos F(ab')₂ cortando un enlace disulfuro en la región bisagra. Los fragmentos F(ab')₂ son divalentes, es decir comprenden dos sitios de unión a antígeno, como la molécula de inmunoglobulina nativa; por

otro lado, los fragmentos Fv (un dímero VH-VL que constituye la parte variable de Fab), dsFv, scFv, Fab, y Fab' son monovalentes, es decir comprenden un único sitio de unión a antígeno.

Anticuerpos quiméricos

[0091] De acuerdo con otra forma de realización de la invención, los anticuerpos están modificados y son, como resultado, anticuerpos quiméricos, que comprenden dominios o hebra(s) de residuos de aminoácidos de diferentes anticuerpos, en particular anticuerpos obtenidos a partir de diferentes especies animales, combinados entre sí en un anticuerpo funcional. En una forma de realización particular, la macromolécula de la invención es un anticuerpo quimérico que consiste en un ensamblaje de fragmentos de anticuerpo de al menos dos especies diferentes. En una forma de realización particular, un anticuerpo quimérico comprende la región constante de un anticuerpo humano. Tales regiones constantes están ilustradas en los ejemplos por fragmentos Fc G1 (SEQ ID No:26) o fragmentos Fc G4 (SEQ ID No:28) o fragmento CL kappa (SEQ ID No:30). Alternativamente, pueden ser usados los fragmentos Fc humanos ilustrados en la Figura 12 (Uniprot P01857, Uniprot P01859, Uniprot P01861) y/o con las secuencias de SEQ ID No:31, SEQ ID No:32, SEQ ID No:33 o SEQ ID No:112. En una forma de realización particular, un anticuerpo quimérico comprende la región variable de un anticuerpo de roedor y la región constante de un anticuerpo humano. En una forma de realización particular, un anticuerpo quimérico comprende la cadena VH con la secuencia de SEQ ID No:2 (N13B2-G1m-VH-FcG1m(E333A)) o la secuencia de SEQ ID No:6 (N13B2-G4m-VH-FcG4m(S228P)) y la cadena VL con la secuencia de SEQ ID No:4 (N13B2-G1m-VL-CLkappa).

Afitinas, anticalinas y otros miméticos de anticuerpo

[0092] Las macromoléculas de la invención también comprenden proteínas artificiales con la capacidad de unirse a antígenos que imitan la de los anticuerpos, también denominadas en la presente mimético de anticuerpo de unión a antígeno. Tales proteínas comprenden afitinas y anticalinas. Las afitinas son proteínas artificiales con la capacidad de unirse a antígenos selectivamente. Son derivadas estructuralmente de la proteína Sac7d de unión a ADN, hallada en *Sulfolobus acidocaldarius*, un microorganismo que pertenece al dominio de las arqueas. Al mezclar al azar los aminoácidos en la superficie de unión de Sac7d, por ej. generando variantes que corresponden a sustitutos al azar de 11 residuos de la interfaz de unión de Sac7d, puede generarse una biblioteca de afitinas y sometiendo la biblioteca de proteínas resultante a rondas de presentación en ribosoma, se puede dirigir la afinidad hacia varias dianas, tales como péptidos, proteínas, virus y bacterias. Las afitinas son miméticos de anticuerpo y están siendo desarrolladas como herramientas en biotecnología. Han sido también usadas como inhibidores específicos para varias enzimas (Krehenbrink et al., 2008).

El experto puede fácilmente desarrollar afitinas con las propiedades de unión requeridas usando los métodos conocidos en el arte, en particular como se divulga en la solicitud de patente WO 2008/068637 y la publicación citada anteriormente, en particular la generación de bibliotecas de presentación en fago y/o ribosoma y su relevamiento usando un antígeno como se divulga en la presente. Las anticalinas son proteínas artificiales que se pueden unir a antígenos, ya sea a proteínas o a pequeñas moléculas. Son mimético de anticuerpo de derivados lipocalinas humanas que son una familia de proteínas de unión naturales. Las anticalinas son aproximadamente ocho veces más chicas, con un tamaño de aproximadamente 180 aminoácidos y una masa de aproximadamente 20 kDa (Skerra, 2008). Se han generado bibliotecas de anticalina de presentación en fago que permiten el relevamiento y selección, en particular de anticalinas con propiedades de unión específicas. El experto puede fácilmente desarrollar afitinas con las propiedades de unión requeridas usando métodos conocidos en el arte, en particular como se divulga en la patente EP 1270725 B1, la patente US 8536307 B2, (Schlehuber y Skerra, 2002) y la publicación citada anteriormente, en particular la generación de bibliotecas de presentación en fago y/o ribosoma y su relevamiento usando un antígeno como se divulga en la presente. Las anticalinas y afitinas pueden ambas ser producidas en un número de sistemas de expresión que comprende sistemas de expresión bacterianos. Así, la invención provee afitinas, anticalinas y otros miméticos de anticuerpo similares con las características de los anticuerpos descritos en la presente, en particular con respecto a la unión a CD127, no inducción y/o inhibición de la internalización de CD127, maduración de CDs, todas las cuales son contempladas como macromoléculas de la invención. **Humanización**

[0093] En una forma de realización particular, las macromoléculas de la invención son anticuerpos humanizados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En consecuencia habiendo sido originalmente obtenidos en animales, especialmente en roedores y en particular en ratas, luego de la inmunización de los animales y producción de anticuerpos monoclonales a partir de un hibridoma, los anticuerpos de la invención son modificados en sus secuencias VH y/o VL por sustitución de residuos aminoácidos, en las secuencias de estructura y opcionalmente además en las secuencias de las CDRs. La humanización puede realizarse mediante modificación de la superficie de la región de estructura (*resurfacing*) o por injerto de CDRs de acuerdo con técnicas conocidas. La modificación de la superficie (*resurfacing*) es lograda especialmente por la sustitución de residuos de roedor por residuos de aminoácidos humanos. La sustitución es realizada de una forma que mantiene la estructura de la región de estructura del anticuerpo original y también la presentación de CDRs, permitiendo así que la interacción de las regiones de estructura y las CDRs en el anticuerpo con superficie modificada (*resurfaced*) preserven la conformación nativa de la superficie que contacta el antígeno de forma tal que conserve la afinidad de unión al antígeno.

[0094] Formas de realización preferidas del anticuerpo de la invención son representadas por las versiones humanizadas del anticuerpo (de rata) N13B2 que comprende las siguientes cadenas liviana y pesada:

[0095] La cadena pesada de N13B2-h1, que tiene la secuencia de SEQ ID No: 36, en donde las secuencias de CDR de N13B2 de rata han sido conservadas, así como algunos pocos otros aminoácidos fuera de las secuencias de CDR, y en donde todos los otros aminoácidos coinciden con la secuencia de un anticuerpo humano. Esta cadena pesada tiene 87,8% de identidad con una cadena pesada de anticuerpo humano. Los siguientes residuos fuera de las secuencias de CDR han sido conservados: V en la posición H24 de Kabat (posición 24 en la Fig. 23; A en la secuencia humana), V en la posición H37 de Kabat (posición 37 en la Fig. 23; I en la secuencia humana), A en la posición H49 de Kabat (posición 49 en la Fig. 23; S en la secuencia humana) y D en la posición H73 de Kabat (posición 74 en la Fig. 23; N en la secuencia humana);

[0096] La cadena pesada de N13B2-h2, que tiene la secuencia de SEQ ID No: 38, en donde, comparada con la cadena pesada de N13B2-h1, los aminoácidos en las posiciones H37, H49 y H73 de Kabat, fuera de las secuencias de CDR, han sido modificados para coincidir con la cadena pesada de un anticuerpo humano;

[0097] La cadena pesada de N13B2-h3, que tiene la secuencia de SEQ ID No: 40, en donde, comparada con la cadena pesada de N13B2-h2, el M en la posición H96 de Kabat (posición 100 en la Fig. 23), dentro de la secuencia de CDR3, ha sido mutada a L para coincidir con la secuencia de una cadena pesada de un anticuerpo humano y/o para evitar modificación post-traducciona. Otros residuos posibles para esta posición incluyen en particular A, F e I y más preferiblemente F o I. En consecuencia, una variante humanizada posible para la secuencia de CDR3 de la VH de N13B2 tiene la secuencia de SEQ ID No: 48.

[0098] La cadena liviana de N13B2-h1, que tiene la secuencia de SEQ ID No: 42, en donde las secuencias de CDR de N13B2 de rata han sido conservadas, así como algunos otros pocos aminoácidos fuera de las secuencias de CDR, y en donde todos los otros aminoácidos coinciden con la secuencia de un anticuerpo humano. Esta cadena liviana tiene 80% de identidad con una cadena liviana de anticuerpo humano. Los siguientes residuos fuera de las secuencias de CDR han sido conservados: V en la posición L48 de Kabat (posición 48 en la Fig. 24; I en la secuencia humana), Y en la posición L71 de Kabat (posición 71 en la Fig. 24; F en la secuencia humana) y F en la posición L87 de Kabat (posición 87 en la Fig. 24; Y en la secuencia humana);

[0099] La cadena liviana de N13B2-h2, que tiene la secuencia de SEQ ID No: 44, en donde, comparada con la cadena liviana de N13B2-h1, los tres aminoácidos en las posiciones L48, L71

y L87 de Kabat, fuera de las secuencias de CDR, han sido modificados para coincidir con la secuencia de la cadena liviana de un anticuerpo humano;

[00100] La cadena liviana de N13B2-h3, que tiene la secuencia de SEQ ID No: 46, en donde, comparada con la cadena liviana de N13B2-h2, los aminoácidos en las posiciones de Kabat L31 (posición 31 en la Fig. 24) y/o L52 (posición 53 en la Fig. 24), dentro de las secuencias de CDR1 y CDR2 respectivamente, han sido mutados de N a Q y de S a T respectivamente, para coincidir con la secuencia de la cadena liviana de un anticuerpo humano y/o para evitar modificación pos-traducciona. Otros posibles aminoácidos para la posición L31 incluyen H y R. Otras posibles mutaciones para la secuencia de CDR3 incluyen conservar la S en la posición L52 y mutar la N en la posición L51 (posición 52 en la Fig. 24) a Q, H, K o R. En consecuencia, una variante humanizada posible para la secuencia de CDR1 de la VL de N13B2 tiene la secuencia de SEQ ID No: 50, y una variante humanizada posible para la secuencia de CDR2 de la VL de N13B2 tiene la secuencia de SEQ ID No: 52.

Anticuerpos o fragmentos multifuncionales

[00101] Estos fragmentos básicos de unión a antígeno de la invención pueden ser combinados entre sí para obtener fragmentos multivalentes de unión a antígeno, tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos. Estos fragmentos multivalentes de unión a antígeno forman parte también de la presente invención.

[00102] Las modificaciones mencionadas anteriormente pueden ser combinadas cuando sea relevante. En formas de realización particulares, la macromolécula es un anticuerpo que es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado y/o un anticuerpo desinmunizado.

Métodos para obtener los anticuerpos de la invención

[00103] Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención es en particular ventajosamente generado contra una molécula que es el CD127 expresado por células T humanas, posiblemente generado a partir de inmunización bajo la forma de un polipéptido nativo o molécula recombinante.

[00104] La inmunización puede ser llevada a cabo de acuerdo con el protocolo divulgado en los Ejemplos a continuación: una quimera recombinante CD127 Fc (10975-H03H Sino Biological, Beijing, China) fue usada para inmunizar ratas tal como ratas de la cepa LOU/C Igk1a disponible de la Universidad de Lovaina, Bélgica). Alternativamente, un antígeno que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID No:115 (en particular que comprende SEQ ID No: 110) y/o de SEQ ID No:117 (en particular que comprende SEQ ID No: 111) y/o de SEQ ID No:116, en donde dicho antígeno comprende adicionalmente otras secuencias, en particular otras secuencias de CD127 humano, o no, como se describe anteriormente, puede

ser usado como el inmunógeno. Se obtuvieron hibridomas fusionando células mononucleares del bazo con el inmunocitoma IR983F de rata LOU, una línea celular no secretora y resistente a azaguanina, de acuerdo con un procedimiento previamente descrito (Chassoux et al., 1988). Los hibridomas fueron primero relevados de acuerdo con la capacidad de los anticuerpos monoclonales secretados de unirse a la molécula CD127 recombinante (CD127 Fc Chimera; 10975-H03H, Sino Biological, Beijing, China). Los hibridomas fueron luego relevados en cuanto a la capacidad de sus anticuerpos monoclonales de unirse a CD127 expresado por células T humanas y en cuanto a la capacidad de inhibir la inducción de la fosforilación de STAT-5 inducida por IL-7 en leucocitos humanos, como se ejemplifica en la Figura 1, y en cuanto a su capacidad de no aumentar la maduración de células dendríticas inducida por TSLP.

[00105] De acuerdo con una forma de realización particular de la invención, un anticuerpo humanizado de la invención se deriva del anticuerpo designado N13B2 por mutación de una o más de las región(es) CDR de su cadena pesada variable (VH) y/o su cadena liviana variable (VL), en particular un anticuerpo que conserva al menos una o dos regiones CDR originales entre las regiones CDR3, CDR2 y CDR1 en cualquiera de VH y/o VL, en donde dicho anticuerpo modificado tiene menos de 10% de residuos aminoácido mutados, preferiblemente uno o ningún residuo aminoácido mutado, en regiones CDR individualmente consideradas con respecto a las regiones originales CDR1, CDR2 o CDR3, en donde dichas regiones originales CDR son

- i. VHCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 10 ;
- ii. VHCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 12 ;
- iii. VHCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No 14 ;
- iv. VLCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No:16 ;
- v. VLCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No:18 ;
- vi. VLCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No:20;

[00106] En consecuencia, la VHCDR3 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 48; la VLCDR1 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 50; la VLCDR2 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 52.

[00107] En una forma de realización particular, un fragmento de unión a antígeno de la invención es un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo N13B2 que se modifica como se describe en los párrafos anteriores, en donde dicho fragmento de unión a antígeno modificado tiene menos de 10% de residuos aminoácido mutados con respecto al fragmento de unión a antígeno original.

[00108] En vista de la enseñanza provista por la presente invención, para expresar anticuerpos de la invención, el experto podrá preparar un hibridoma o usará tecnologías alternativas tales como bibliotecas de expresión y sistemas de expresión, seguidas de selección de anticuerpos que tengan la estructura de aquellos secretados por el hibridoma y que tengan sus propiedades, en particular sus propiedades de unión y neutralización. Bibliotecas de ADNc pueden prepararse adecuadamente a partir del ARN expresado en un hibridoma de la invención y las secuencias apropiadas seleccionadas y expresadas. Alternativamente, se preparan por síntesis ADNc que codifican los anticuerpos de la invención o sus fragmentos.

[00109] “*Células de hibridoma*” de acuerdo con la invención son células generadas a partir de la fusión de células productoras de anticuerpos (linfocitos B) de un animal previamente inmunizado con un inmunógeno seleccionado y un compañero de fusión que son células de mieloma que permiten proveer inmortalidad a la célula fusionada resultante. Las células de mieloma y las células productoras de anticuerpo (células B tales como esplenocitos) pueden ser del mismo origen, y son células eucariotas en particular células de mamífero del mismo animal. Pueden ser alternativamente de origen diferente, dando así lugar a un heterohibridoma. Las células de mieloma tal como el inmunocitoma IR983F de rata LOU, una línea celular secretora y resistente a azaguanina se eligen entre células que no producen inmunoglobulinas para permitir que el hibridoma preparado secrete sólo anticuerpos monoclonales de la especificidad deseada. Otras células adecuadas para promover ADCC tales como aquellas descritas en las páginas siguientes para la preparación de los anticuerpos a través de expresión en células recombinantes pueden ser usadas en lugar del inmunocitoma de rata. Tales células son ventajosamente células que tienen baja o no tienen capacidad de fucosilación.

[00110] La preparación de un hibridoma adecuado para llevar a cabo la invención se realiza de acuerdo con técnicas convencionales. Las formas de realización se describen en detalle en los Ejemplos de la presente solicitud de las cuales las características particulares divulgadas pueden ser adaptadas para otras células usadas como compañeros de fusión.

[00111] Los fragmentos del anticuerpo de unión a antígeno pueden obtenerse a partir del anticuerpo, especialmente usando digestión enzimática de acuerdo con técnicas bien conocidas que incluyen digestión con papaína o pepsina, o usando cualquier técnica de clivaje apropiada. Pueden ser alternativamente expresados en células hospedantes modificadas por recombinación con secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de dichos fragmentos, o pueden ser sintetizados, especialmente sintetizados químicamente. En consecuencia, los anticuerpos de la invención, que incluyen los anticuerpos modificados y los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos pueden también ser preparados por

técnicas clásicas de ingeniería genética, tales como aquellas descritas por Sambrook et al. (Deininger, 1990) y versiones actualizadas). La invención se refiere en consecuencia a las versiones de los polipéptidos VH y VL que comprenden o no el péptido señal. El péptido señal puede ser necesario durante la preparación de los polipéptidos en células.

[00112] Con el fin de utilizar el anticuerpo de la invención o sus fragmentos funcionales para administración a un paciente humano, puede ser beneficioso derivar anticuerpos monoclonales humanizados o anticuerpos monoclonales quiméricos y/o anticuerpos desinmunizados, a partir de anticuerpos de la invención que serían anticuerpos de no primate tales como aquellos ilustrados en los Ejemplos, especialmente para reducir la reacción inmune del hospedante receptor o paciente contra dichos anticuerpos. Fragmentos funcionales de estas variantes de anticuerpos pueden obtenerse también como variantes humanizadas, quiméricas o desinmunizadas.

[00113] Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que es un anticuerpo humanizado puede también derivarse por sustitución de residuo(s) de aminoácido(s) presente(s) en región(es) constante(s) de cadenas variables (VH y/o VL) de un anticuerpo no humano de la invención, para el(los) residuo(s) de aminoácido(s) humano(s) que tienen ubicaciones correspondientes en anticuerpos humanos de acuerdo con definiciones y numeración estándar, en donde el nivel de sustitución es de 1% a 20%, en particular de 1% a 18% de los residuos en dichas regiones de estructura. Dichas regiones constantes incluyen aquellas regiones de estructura (FWRs, por sus siglas en inglés) definidas en anticuerpos de cuatro cadenas identificadas en particular en referencia a la numeración de Kabat.

[00114] Ejemplos particulares de anticuerpos modificados de acuerdo con la invención comprenden anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y/o anticuerpos desinmunizados.

[00115] Un anticuerpo modificado particular tiene residuos de aminoácido modificados en las regiones CDRs, en donde dicha modificación da por resultado una desinmunización por pérdida de los epítopes de la célula T en el dominio variable del anticuerpo no humano. La desinmunización puede realizarse luego de la determinación de los epítopes de la célula T en el dominio variable del anticuerpo, especialmente por predicción *in silico*, seguida de mutación puntual en la secuencia de las cadenas variables del anticuerpo que eliminan los epítopes funcionales de la célula T. En una forma de realización preferida de la invención, la modificación de las regiones CDR(s), especialmente de las regiones CDR3 están limitadas en la medida necesaria para la desinmunización con el fin de administración al cuerpo humano, por ej. para disminuir la afinidad de unión de los receptores de la célula T para complejos HLA-clase II/péptido. En una forma de realización particular, la(s) región(es) CDR3 de la VH y/o de

la VL no está(n) modificada(s). En otra forma de realización las regiones FR y/o CH están también modificadas, especialmente humanizadas.

[00116] Anticuerpos dentro del marco de la invención comprenden en consecuencia un anticuerpo basado en las características definidas anteriormente, que es un anticuerpo humanizado especialmente uno obtenido por sustitución de residuo(s) aminoácido presente(s) en la(s) región(es) de estructura de un anticuerpo de la invención, para residuo(s) aminoácido humano(s) que tiene(n) una ubicación correspondiente en anticuerpos humanos de acuerdo con la definición y numeración estándar. El nivel de sustitución de residuos de aminoácidos en las regiones de estructura y/o en las CDRs para humanización, incluyendo desinmunización, es de 1% a 20% en particular de 1% a 18% de los residuos en dichas regiones de estructura y/o regiones CDRs. Como se menciona anteriormente, la humanización apunta principalmente a las regiones de estructura de los anticuerpos originales. En algunos casos, la humanización puede referirse alternativamente o también a la(s) región(es) CDR especialmente la(s) región(es) CDR1 y/o CDR2 y se designa más particularmente como desinmunización. En formas de realización particulares, no más de un aminoácido es modificado en cada región CDR. Ejemplos de anticuerpos humanizados y/o desinmunizados derivados del anticuerpo de rata N13B2 se divulgan en la presente.

[00117] La humanización puede por lo tanto lograrse considerando las regiones de estructura de la cadena liviana o cadena pesada de línea germinal humana que presentan la identidad de secuencia más alta con la secuencia del anticuerpo no humano o fragmento, y seleccionando los residuos aminoácidos, especialmente los residuos expuestos en la superficie del anticuerpo, a ser sustituidos en dicho anticuerpo no humano o fragmento del mismo, para conformar el(los) correspondiente(s) residuo(s) humano(s). En una forma de realización particular algunas o todas las regiones FRL y/o algunas o todas las regiones FRH son completamente humanas, es decir, son características de secuencias de estructura humanas. En otra forma de realización residuos seleccionado en algunas o todas las regiones FR son sustituidos.

[00118] Los métodos para humanizar anticuerpos son también bien conocidos en el arte y están descritos por ejemplo por Routledge et al. (Edward G. Routledge, 1993). Estos métodos pueden también aplicarse a fragmentos de unión a antígeno, tal como scFvs. A modo de ejemplo, el método conocido como "*resurfacing*" consiste en reemplazar el conjunto de residuos de superficie en las regiones de estructura de la región variable de un anticuerpo no humano con un conjunto de residuos de superficie humanos, mientras que el método conocido como injerto de CDRs consiste en transferir las CDRs de un anticuerpo no humano a las regiones de estructura de un anticuerpo humano. El injerto de CDRs se completa generalmente con optimización de la estructura, que consiste en el reemplazo de algunos

residuos en la estructura humano, para optimizar la afinidad de unión. La etapa de optimización de la estructura, ha sido simplificada recientemente por el uso de bibliotecas combinatorias (Rosok et al., 1996) (Baca et al., 1997).

[00119] La invención se refiere en particular a anticuerpos humanizados derivados por injerto de CDRs del anticuerpo N13B2 de rata. Las secuencias humanas VH y VL que tienen secuencias con gran homología con las secuencias VH y VL de N13B2 de rata, respectivamente, se seleccionaron en una base de datos. Las secuencias de CDR de N13B2 se injertaron en estas secuencias humanas. Algunos residuos fuera de las secuencias de CDRs pueden tener un impacto significativo en el reconocimiento o la afinidad al antígeno, en particular residuos en la proximidad inmediata de las CDRs y residuos conocidos como residuos Vernier. Como se detalla anteriormente y en la sección Ejemplos, en particular en el Ejemplo 12, se probaron varias versiones de los anticuerpos humanizados: las más conservativas donde todas las secuencias de rata se conservaron para la CDR y los anteriormente mencionados residuos estructuralmente importantes, una versión donde las secuencias humanas se seleccionaron para los residuos estructuralmente importantes y la versión más cercana a las secuencias humanas, donde, además de los residuos estructuralmente importantes fuera de la CDR, se modificaron algunos pocos residuos dentro de la CDR a partir de la secuencia inicial de rata para prevenir en particular modificaciones post-traduccionales tales como oxidación o desamidación.

[00120] Otra estrategia reciente disponible para la humanización de anticuerpos preserva sólo las secuencias de CDR3 no humana de cadena liviana y pesada originales mientras que la secuencia restante se selecciona de bibliotecas del gen V humano naïve (Rader et al., 1998).

[00121] Los anticuerpos quiméricos, humanizados o desinmunizados de la invención pueden pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulinas, como los anticuerpos no modificados. Preferiblemente, pertenecen a una subclase de la clase de la IgG tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

[00122] Los métodos para preparar fragmentos de unión a antígeno recombinantes, o anticuerpos quiméricos combinando las regiones variables de un anticuerpo con enlazadores apropiados, o con las regiones constantes de otro anticuerpo, son bien conocidos en el arte.

[00123] Se dice que los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales, significando que una composición de estos anticuerpos es homogénea, especialmente idéntica, en términos de especificidad de unión a antígeno y en consecuencia en términos de composición de la región variable. Por lo tanto los anticuerpos puede calificarse como monoclonales aún si se obtienen por técnicas alternativas a la técnica de hibridoma.

[00124] De acuerdo con otra forma de realización, la invención también se refiere a una molécula quimérica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las definiciones provistas en la presente o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo está asociado con una molécula funcionalmente distinta. Una molécula quimérica de la invención puede ser o bien una proteína de fusión quimérica o un conjugado que resulta de cualquier forma de unión adecuada que incluye unión covalente, injerto, unión química con un grupo químico o biológico o con una molécula, tal como un polímero PEG u otro grupo protector o molécula adecuada para la protección contra clivaje por proteasas *in vivo*, para mejora de la estabilidad y/o vida media del anticuerpo o fragmento funcional. Con técnicas similares, especialmente por acoplamiento químico o injerto, una molécula quimérica puede prepararse con una molécula biológicamente activa donde dicha molécula es elegida por ejemplo entre las toxinas, en particular exotoxina A de *Pseudomonas* (Risberg et al., 2011), la cadena A de la toxina vegetal ricina (van Oosterhout et al., 2001) o la saporintoxina (Flavell et al., 2006), especialmente un ingrediente activo terapéutico, un vector (incluyendo especialmente un vector de proteína) adecuado para dirigir el anticuerpo o fragmento funcional a células o tejidos específicos del cuerpo humano, o puede estar asociado con un marcador o un enlazador, especialmente cuando se usan fragmentos del anticuerpo.

[00125] La PEGilación del anticuerpo o fragmentos funcionales del mismo es una forma de realización particular interesante ya que mejora las condiciones de administración de la sustancia activa al hospedante, especialmente para una aplicación terapéutica. La PEGilación puede ser específica para el sitio para prevenir interferencia con los sitios de reconocimiento de los anticuerpos o fragmentos funcionales, y puede llevarse a cabo con PEG de alto peso molecular. La PEGilación puede lograrse a través de los residuos de cisteína libres presentes en la secuencia del anticuerpo o fragmento funcional o a través de residuos de cisteína libres agregados a la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento funcional.

[00126] La invención se refiere también a una composición que comprende anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos como se define en la presente, en donde los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos son una población homogénea de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o son anticuerpos monoclonales o fragmentos funcionales de los mismos.

[00127] En algunos casos es posible usar una composición de productos para obtener el efecto deseado, donde cada uno de los productos en la composición genera al menos un efecto deseado. En el presente caso, por ejemplo, es posible combinar moléculas que tienen un efecto inhibitorio en la interacción IL-7-IL-7R y moléculas que tienen efecto citotóxico contra células CD127-positivas. Tales combinaciones están incluidas en la invención. De manera

importante, en la invención, la composición de productos no debe presentar sinergia con TSLP para la maduración de células dendríticas. Usualmente, esto involucra combinar productos de los cuales ninguno individualmente presenta sinergia con TSLP para la maduración de células dendríticas.

[00128] En una forma de realización particular, la invención se refiere a una composición o un conjunto de compuestos que comprende anticuerpos, fragmentos o moléculas quiméricas como se describe en la presente, en donde dicha composición comprende (i) una población de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos o moléculas quiméricas que tienen actividad citotóxica contra células CD127-positivas, especialmente células T CD127+ y (ii) una población de anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos o moléculas quiméricas que tienen propiedades antagonistas hacia IL-7 humana, en donde estas poblaciones de anticuerpos están o bien combinadas en una mezcla o bien separadas y, en esta última opción, formuladas para administración combinada o secuencial. Los anticuerpos y/o fragmentos funcionales y/o moléculas quiméricas no presentan sinergia con TSLP para la maduración de células dendríticas.

[00129] Las definiciones provistas en la presente especialmente en referencia a los anticuerpos de la invención, se aplican de manera similar a los fragmentos de unión a antígeno de los mismos excepto cuando obviamente es técnicamente no relevante. Estas definiciones también se aplican a macromoléculas (en particular anticuerpos quiméricos o moléculas quiméricas) o a composiciones que comprenden estos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos o a derivados de estos anticuerpos, como se divulga en la presente solicitud. Se especifica además que los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de la invención se derivan de los anticuerpos desde un punto de vista conceptual o de diseño pero pueden ser preparados mediante varias técnicas, no necesariamente que recurren a los anticuerpos como productos.

[00130] La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una macromolécula de acuerdo con cualquiera de las definiciones provistas en la presente. En formas de realización particulares, el ácido nucleico de la invención codifica un aminoácido elegido del grupo que consiste en SEQ ID No:2; SEQ ID No:4; SEQ ID No:6; SEQ ID No:8; SEQ ID No:10; SEQ ID No:12; SEQ ID No:14; SEQ ID No:16; SEQ ID No:18; SEQ ID No:20; SEQ ID No:22, SEQ ID No:24, SEQ ID No:36, SEQ ID No:38, SEQ ID No:40, SEQ ID No:42, SEQ ID No:44, SEQ ID No:46, SEQ ID No:48, SEQ ID No:50, SEQ ID No:52, SEQ ID No:54, SEQ ID No:56, SEQ ID No:110, SEQ ID No:111, SEQ ID No:86, SEQ ID No:115, SEQ ID No:116 y SEQ ID No:117. En formas de realización particulares, el ácido nucleico de la invención comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 o 55.

[00131] Tal ácido nucleico adecuado para la preparación de macromoléculas de la invención es especialmente elegido del grupo de:

- i. un polinucleótido que codifica una región VH y que tiene la secuencia de SEQ ID No 1 o SEQ ID No: 5 o SEQ ID No:54 o la región variable de una región VH y que tiene la secuencia de SEQ ID No:21 o SEQ ID No: 35 o SEQ ID No:37 o SEQ ID No:39;
- ii. un polinucleótido que codifica una región VL que tiene la secuencia de SEQ ID No 3 o SEQ ID No: 7 o SEQ ID No:56 o la región variable de una región VL y que tiene la secuencia de SEQ ID No:23, o SEQ ID No: 41 o SEQ ID No:43 o SEQ ID No:45;
- iii. un polinucleótido que codifica una región VHCDR1 que tiene la secuencia de SEQ ID No:9,
- iv. un polinucleótido que codifica una región VHCDR2 que tiene la secuencia de SEQ ID No:11,
- v. un polinucleótido que codifica una región VHCDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID No:13 o de SEQ ID No:47,
- vi. un polinucleótido que codifica una región VLCDR1 que tiene la secuencia de SEQ ID No 15 o de SEQ ID No:49,
- vii. un polinucleótido que codifica una región VLCDR2 que tiene la secuencia de SEQ ID No 17 o de SEQ ID No:51,
- viii. un polinucleótido que codifica una región VLCDR3 que tiene la secuencia de SEQ ID No 19.

[00132] La invención también se refiere a un polinucleótido que tiene nucleótidos modificados con respecto a la secuencia de SEQ ID No 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 o 55, y que:

- (a)codifica un polipéptido que tiene secuencias de aminoácidos de SEQ ID No 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54 o 56, respectivamente y/o
- (b)tiene al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, y lo más preferible al menos 98% o al menos 99% de identidad sobre toda su longitud con uno de los polinucleótidos que tiene respectivamente la secuencia de SEQ ID No 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 o 55 y/o,
- (c)es un fragmento del polinucleótido que tiene una secuencia de secuencia SEQ ID No: 1, 3, 5, 7, 21, 23, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 53 o 55, y codifica un polipéptido que comprende o que consiste en un fragmento de unión a antígeno.

[00133] Los polinucleótidos de la invención pueden ser también secuencias optimizadas, especialmente para la expresión en células hospedantes. Las técnicas de optimización en este campo son las convencionales.

[00134] Los fragmentos de polinucleótido de la invención tienen ventajosamente una secuencia de al menos 9 nucleótidos, en particular al menos 18 nucleótidos y son más cortos que su secuencia de origen, especialmente más cortos que las secuencias de VH o VL de longitud completa ilustradas respectivamente.

[00135] De acuerdo con una forma de realización particular, los polinucleótidos de la invención pueden ventajosamente comprender, además de una secuencia que codifica una macromolécula de acuerdo con la invención, aguas arriba de la secuencia que codifica las cadenas de anticuerpo, una secuencia que codifica un péptido señal que permite la secreción de dicha proteína cuando está expresada en una célula productora. Pueden también comprender una o más secuencia(s) que codifica(n) uno o más péptido(s) marcador(es) para detectar, y/o facilitar la purificación de, dicha proteína.

[00136] La invención también se refiere a un vector para la clonación y/o para la expresión de un polinucleótido divulgado en la presente. En una forma de realización particular, el vector de la invención es un plásmido adecuado para clonación y/o que se expresa en células de mamífero, que comprende secuencias de regulación para transcripción y expresión.

[00137] La invención se refiere además a células o líneas celulares recombinadas con un polinucleótido de la invención, especialmente una célula de mamífero o una célula o línea celular aviar. Por ejemplo células de ovario de hámster chino, genéticamente modificadas para reducir la fucosilación global. En efecto, anticuerpos que carecen de fucosilación núcleo muestran una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) significativamente aumentada (von Horsten et al., 2010). Otro ejemplo es la línea celular EB66 que en forma natural tiene bajas propiedades de fucosilación (Olivier et al., 2010).

[00138] Así la invención también se refiere a un método para preparar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

- (a) obtener un hibridoma luego de inmunizar un animal, especialmente un mamífero con la cadena alfa humana del receptor IL-7 humano, preferiblemente con un antígeno del mismo que comprende las secuencias de CD127 humano con las secuencias de SEQ ID No:115 (y/o SEQ ID No: 110) y/o SEQ ID No:117 (y/o SEQ ID No: 111) y/o SEQ ID No:116 (y/o SEQ ID No:86), en donde dicho antígeno comprende otras secuencias de CD127 humano o no, como se divulga anteriormente, y, cuando sea necesario, re-estimular dicho animal con el mismo inmunógeno, recuperando células del bazo o de ganglio linfático del animal que responde a la inmunización y fusionando dichas células con células de mieloma para aislar anticuerpos monoclonales y/o

- (b) expresar polinucleótidos que codifiquen para dichos anticuerpos tales como polinucleótidos divulgados en la presente con sus secuencias de nucleótidos en forma recombinante en células en condiciones que permiten la recuperación de anticuerpos, y
- (c) recuperar anticuerpos que reconocen un epítipo como se define en la presente, en particular que comprenden secuencias del sitio 2b de CD127 y en particular que comprenden tales secuencias y además secuencias del dominio D1 de CD127, en particular anticuerpos que tienen la afinidad de unión deseada contra la cadena alfa del receptor IL-7 humano.

[00139] En una forma de realización particular de la invención, los anticuerpos o su fragmento están preparados en células que presentan bajas propiedades de fucosilación, tales como células aviares EB66.

[00140] La invención se refiere también a un método de selección de anticuerpos que comprende las etapas de obtención, posiblemente a través de uno de los métodos descritos en la presente, de anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a CD127, en particular un antígeno del mismo como se describe anteriormente, y seleccionar entre estos anticuerpos aquellos que no aumentan la maduración de células inmunes inducida por TSLP, en particular células dendríticas, que no inducen la internalización de CD127 y/o que inhiben la internalización de CD127 inducida por IL-7 y/o que inhiben la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$ *in vitro* y/o *in vivo*. La selección puede llevarse a cabo usando cualquiera de los procedimientos descritos en la sección de Ejemplos para evaluar el aumento o disminución de la expresión de los marcadores de superficie celular CD40 y/o CD80 inducida por TSLP o evaluar los efectos en la internalización de CD127 o evaluar los efectos en la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$. Tales pruebas pueden ser convenientemente realizadas en placas de 96 pocillos para permitir una búsqueda rápida y eficiente de un gran número de anticuerpos candidatos y la lectura puede realizarse por inmunotinción clásico y análisis de citometría de flujo. Así, la invención se refiere a un método de seleccionar anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de los mismos u otra macromolécula que comprende o consiste en al menos uno de las siguientes etapas:

- a. Evaluar (por ej. como se describe en el Ejemplo 1, Ejemplo 2, Ejemplo 6 y/o **Error! Reference source not found.**) una macromolécula con la capacidad de unión de la macromolécula a CD127, en particular a un antígeno de la misma como se divulga en la presente;
- b. Evaluar (por ej. como se describe en la Figura 16 y/o Ejemplo 5) la internalización de CD127 inducida por la presencia de la macromolécula en células que expresan CD127;

- c. Evaluar (por ej. como se describe en la Figura 16 y/o Ejemplo 5) la inhibición causada por la macromolécula de la internalización de CD127 inducida por IL-7 en células que expresan CD127;
 - d. Evaluar (por ej. como en la Figura 5, Figura 6 y/o Ejemplo 9) el aumento en la maduración de CDs inducido por TSLP en presencia de la macromolécula;
- y opcionalmente que comprenden al menos uno, de las siguientes etapas:
- e. Evaluar (por ej. como en la Figura 1, Figura 2 y/o Ejemplo 3) la inhibición por la macromolécula de la señalización inducida por IL-7, en particular la fosforilación de STAT5;
 - f. Evaluar (por ej. como en el Ejemplo 9, Figura 5 y/o Figura 6) la inhibición por la macromolécula de la producción de TARC inducida por TSLP;
 - g. Evaluar (por ej. como en el Ejemplo 16, Figura 19 y/o Figura 20) la inhibición causada por la macromolécula de la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$, en particular la expresión en superficie celular en linfocitos T;
 - h. Evaluar (por ej. como en el , Figura 28) la interrupción de la unión de CD127 a la cadena γc por el anticuerpo, en particular en presencia de IL-7.

Estando cada una de estas etapas de prueba seguidas por la selección de una o más macromoléculas que tienen las características funcionales deseadas, como se divulga en la presente.

Como se menciona anteriormente, cuando se desea que el anticuerpo reconozca un epítoto que comprende secuencias que no son contiguas en la secuencia de CD127, es posible evaluar sucesivamente el reconocimiento de (o la unión a) fragmentos del epítoto que consisten (o esencialmente que consisten) en una secuencia contigua de CD127. Por ejemplo, si se desea obtener un anticuerpo que reconozca un epítoto que comprende las secuencias SEQ ID No:115, SEQ ID No:116 y SEQ ID No:117, es posible seleccionar en primer lugar anticuerpos que reconocen un epítoto que consiste esencialmente en SEQ ID No:116, y luego en segundo lugar seleccionar, entre estos anticuerpos seleccionados en primer lugar, anticuerpos que reconozcan un epítoto que consiste esencialmente en SEQ ID No:115, y luego seleccionar, entre estos anticuerpos seleccionados en segundo lugar, anticuerpos que reconozcan un epítoto que consiste esencialmente en SEQ ID No:117. Obviamente, el orden de selección puede modificarse en relación a este orden, provisto únicamente como un ejemplo.

[00141] Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una macromolécula de acuerdo con la invención, con un vehículo farmacéutico, en donde dicha composición farmacéutica opcionalmente además comprende un ingrediente activo diferente.

[00142] La invención también se refiere a una composición que comprende como un ingrediente activo, una macromolécula de la invención o una composición farmacéutica como se define anteriormente, en una formulación adecuada para controlar la supervivencia o expansión de células CD127-positivas humanas, en particular células efectoras CD127-positivas humanas, especialmente la supervivencia o expansión de células T de memoria CD127+, especialmente células T de memoria que son tanto CD127+ como CD8+, o que son tanto células CD127+ como CD4+, cuando se la administra a un paciente humano. En una forma de realización particular, la composición que comprende la macromolécula de la invención como un ingrediente activo está en una formulación adecuada para controlar la diferenciación y/o maduración de células dendríticas cuando se la administra a un paciente humano.

[00143] Una composición de la invención puede comprender adicionalmente un compuesto adicional que tenga un efecto terapéutico inmunomodulador, en particular en células involucradas en alergia o autoinmunidad. Con propósitos ilustrativos, inmunomoduladores de interés a modo de ejemplo son otros anticuerpos monoclonales con diana en células T, tales como anticuerpos anti-CD3, anti-ICOS o anti-CD28 o proteínas recombinantes o anticuerpos que tienen diana en células accesorias tales como anticuerpos CTLA4Ig o anti-CD40.

[00144] La invención se refiere también a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula quimérica como se define o se ilustra en la presente, para uso como ingrediente activo en una combinación o en un régimen terapéutico aditivo (*add-on*) en un paciente en necesidad del mismo. Se contempla también el uso de una macromolécula, un ácido nucleico, un células o una línea celular de la invención como un ingrediente terapéuticamente activo en combinación o en un régimen terapéutico *add-on* en un paciente en necesidad del mismo.

[00145] Una macromolécula de acuerdo con la invención, un ácido nucleico, vector, célula, línea celular, composición farmacéutica o una composición como se definen en la presente se contemplan en particular para uso en un paciente humano para tratar condiciones patológicas influenciadas por respuestas inmunes, especialmente por respuestas de células T de memoria. En consecuencia, los inventores propusieron que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo, la molécula quimérica de acuerdo con la invención, la composición farmacéutica o la composición como se definen en la presente sean usados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o alérgicas en particular trastornos alérgicos de la piel, trastornos intestinales o para rechazo de trasplante o para el tratamiento de leucemia tal como la leucemia linfoblástica aguda (por ej. T-ALL) o linfoma tal como el linfoma de Hodgkin, o el tratamiento de una enfermedad de cáncer tal como cáncer de mama asociado con células

CD127+, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, o para el tratamiento de un linfoma cutáneo de células T, tal como el linfoma de Sezary, o para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda con mutación de ganancia de función de la ruta IL-7-R/TSLP.

[00146] En varias formas de realización, la invención se refiere al uso de macromoléculas como se definen en la presente para agotar las células CD127-positivas mientras que se preservan las células CD127-negativas.

[00147] En varias formas de realización, la invención se refiere al uso de macromoléculas como se define en la presente para evitar la diferenciación y/o expansión y/o maduración de células CD127-positivas, en particular la diferenciación, expansión, o maduración inducida por IL-7 y/o TSLP, mientras que no tiene o tiene poco efecto directo en células CD127-negativas.

[00148] En una forma de realización particular, la invención se refiere al uso de macromoléculas definidas en la presente para eliminar/neutralizar células T naïve y de memoria interfiriendo con la señalización inducida por IL-7, mientras que se preservan las células Treg.

[00149] En una forma de realización particular, la invención también se refiere al uso de macromoléculas definido en la presente para agotar subpoblaciones de linfocitos, u otras poblaciones celulares que expresan CD127 (que incluyen linfocitos T y B normales o patológicos, células NK, células dendríticas y otros tipos celulares que incluyen células epiteliales) como resultado de la acción citotóxica de los anticuerpos, posiblemente pero no exclusivamente a través de ADCC (por sus siglas en inglés, Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo) y opcionalmente a través de CDC (por sus siglas en inglés, Citotoxicidad Dependiente del Complemento).

[00150] En las formas de realización anteriores, los usos contemplados son también aplicados a ácidos nucleicos, vectores, células, líneas celulares y composiciones de la invención.

[00151] Por “*tratamiento*” o “*tratamiento terapéutico*”, se quiere decir que las etapas de administración realizadas dan por resultado una mejora de la condición clínica de un paciente animal o humano en necesidad del mismo, quien sufre de trastorno(s) asociado(s) con la ruta IL-7, es decir que involucra la activación o proliferación de células CD127-positivas. Tal tratamiento apunta a mejorar el estado clínico del paciente animal o humano, eliminando o aliviando los síntomas asociados con el(los) trastorno(s) relacionado(s) a la ruta IL-7, es decir que involucra la activación o proliferación de células CD127-positivas. En una forma de realización preferida, el tratamiento de acuerdo con la invención permite recuperar la salud. En

una forma de realización preferida, dicho tratamiento no tiene efectos negativos no deseados debido a la maduración aumentada de células inmunes, en particular de células dendríticas.

[00152] La invención incluye el uso de las macromoléculas en el tratamiento de condiciones patológicas que involucran la alteración de la respuesta inmune en un paciente humano que conduce a un estado tolerogénico dominante o, al contrario, la falta de tolerancia donde el control del nivel de la respuesta inmune sería necesitado así como la destrucción de células CD127-positivas malignas.

[00153] La invención provee medios apropiados para uso en patologías tal como aquellas inducidas por rechazo a trasplante, enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas, enfermedades respiratorias, infecciones virales crónicas, linfoma, leucemia u otras enfermedades de cáncer incluyendo aquellas que resultan de tumores sólidos (por ej. cáncer de mama) cuando estas patologías están asociadas con células CD127-positivas así como la ruta de señalización de IL-7 y en donde debe evitarse un aumento en la maduración de células dendríticas.

[00154] En una forma de realización particular, la invención se refiere al uso de una macromolécula, un ácido nucleico, una célula, una línea celular o composición de la invención en un paciente humano para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o una enfermedad alérgica o para el tratamiento de leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda o para el tratamiento de linfoma, o para el tratamiento de enfermedad de cáncer, o para el tratamiento de una enfermedad viral crónica, o para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, o para el tratamiento de enfermedades respiratorias, o para el tratamiento de síntomas relacionados a trasplantes.

[00155] En una forma de realización particular, la invención se refiere a un método de tratamiento que comprende la administración de una macromolécula, un ácido nucleico, una célula, una línea celular o composición de la invención en un paciente humano para el tratamiento de una enfermedad autoinmune o una enfermedad alérgica o para el tratamiento de leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda o para el tratamiento de linfoma, o para el tratamiento de enfermedad de cáncer, o para el tratamiento de una enfermedad viral crónica, o para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, o para el tratamiento de enfermedades respiratorias, o para el tratamiento de síntomas relacionados a trasplantes.

[00156] Características y propiedades adicionales de la invención serán evidentes a partir de los Ejemplos y las figuras que siguen.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Inhibición de la señalización de IL-7R. Inhibición de linfocitos T pSTAT5+ inducidos por IL-7 en respuesta a dosis de anticuerpos monoclonales anti-IL-7R α humana. N13B2 (cuadrado), N13E5 (círculo) y N13K12 (triángulo). pSTAT5 (%): relación (%) de células positivas para fosfo-STAT5, como se mide mediante FACS. La inhibición dependiente de dosis de la fosforilación de STAT5 es similar para los tres clones, inhibiendo los tres eficientemente la fosforilación a 50 ng/ml (aproximadamente 50% de inhibición) y completamente a 100 a 500 ng/ml (>95% de inhibición).

Figura 2. Inhibición de la señalización de IL-7R por mAb N13B2. Ejes como en la Figura 1. (A). Inhibición de linfocitos T pSTAT5+ inducidos por IL-7 en respuesta a dosis de mAb N13B2 (cuadrados) comparado con mAb Md707-3 (círculos), ambos en formato roedor. (B). Mismo experimento que en (A) con IgG humana (cuadrados) y formas quiméricas IgG4 (círculo) humana de N13B2 en presencia de 0,1 (símbolos vacíos) o 5 ng/ml (símbolos llenos) de IL-7 humana recombinante. N13B2 es más eficiente en la inhibición de STAT5 que MD707-13 (~50% de inhibición a 100 ng/ml para N13B2, vs. 1000 ng/mL para MD707-13), mientras que diferentes isotipos de IgG de N13B2 exhiben una eficiencia de inhibición comparable.

Figura 3. (A) Estudios de unión de anticuerpo de rata N13B2 anti-CD127. Se inyectaron anticuerpo N13B2 o MD707-1 en un antígeno CD127 inmovilizado a diferente concentración. Dif. Resp.: Diferencia de respuesta. Tiempo: tiempo en seg (duración total: 20 min). Blc: blanco (sin anticuerpo). Las curvas de asociación y disociación fueron analizadas con el modelo “*Bivalent analyte*” con el programa BIAeval 4. Los resultados se presentan en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1. *Resultados de estudios de unión*

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)
MD707-1	2,66 E+05	1,21E-04	2,19E+09	4,56E-10
N13B2	2,01E+05	1,60E-05	1,26E+10	7,96E-11

Tabla 2. *Kd de N13B2 y sus quimeras descritas en (A) en un experimento separado*

Anticuerpo	Ka1 (1/Ms)	Kd1 (1/s)	Rmax (UR)	KA (1/M)	KD (M)
N13B2 de rata	9,63E+04	4,75E-06	115	2,03E+10	4,93E-11
N13B2-G1	1,49E+05	5,62E-05	109	2,65E+09	3,77E-10

N13B2-G4	2,01E+04	3,41E-06	94,9	5,89E+09	1,70E-10
----------	----------	----------	------	----------	----------

Figura 4. Se midió la actividad anti-CD127 de los nuevos anticuerpos N13B2 mediante ensayo ELISA utilizando un antígeno hCD127 recombinante. DO 450 nm. A. La actividad de unión a CD127 del N13B2 (círculo lleno) fue comparada con la generación previa de anticuerpos (MD707-1 (rombo vacío), 3 (triángulo vacío) y 6 (cuadrado lleno)). El N13B2 aparece como el ligante más eficiente en el ensayo. B. Se comparó la actividad para CD127 entre diferentes formatos de N13B2 (rata, IgG1 (círculo) o IgG4 (cuadrado)). No se observó diferencia significativa en la actividad de unión.

Tabla 3. *ED₅₀ de anticuerpos seleccionados*

	ED ₅₀ (ng/ml)		ED ₅₀ (ng/ml)
N13B2	65,64	St cMD707-3-G1	16,1
MD707-1	122,93	cN13B2-G1	12
MD707-3	293,32	cN13B2-G4	12,6
MD707-6	2789,41		

Figura 5. Producción de TARC (por sus siglas en inglés, Quimioquina Activada y Regulada del Timo, CCL17) y expresión del marcador de superficie celular CD80 por células dendríticas mieloides, inducidas por TSLP. Ninguna: sin estimulación. LPS: estimulación con lipopolisacárido. TSLP: estimulación con TSLP. A) Cuantificación de producción de TARC en sobrenadante mediante ELISA y B) expresión en superficie celular de CD80 mediante citometría de flujo de células dendríticas CD1C+ de sangre humana cultivadas durante 24 horas con medio solamente, 1 µg/ml de LPS o 15 ng/ml de TSLP. Los datos son media ± error estándar o la concentración media (SEM) de 3 experimentos independientes.

Figura 6. Inhibición de la producción de TARC inducida por TSLP por anticuerpos anti-CD127 humano. Cuantificación mediante ELISA de producción de TARC en sobrenadante de células dendríticas CD1C+ de sangre humana cultivadas durante 24 horas con 15 ng/ml de TSLP y diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CD127 humano: anticuerpo N13B2 (círculo), MD707-6 (triángulo) y anti-TSLP como control (X). Los datos son representativos de tres experimentos independientes a partir de tres donadores de sangre diferentes. N13B2 inhibe sólo muy moderadamente la inducción de

la secreción de TARC ((~20% de inhibición a 6 µg/mL), mientras que MD707-13 y anti-TSLPR son inhibidores más eficientes (resp. ~50% y ~70% de inhibición).

Figura 7. Efectos de anticuerpos anti-CD127 en la expresión de los marcadores de maduración de células dendríticas CD80 y CD40 inducida por TSLP. Las células fueron activadas mediante TSLP a 15 ng/ml durante 24 horas. Se agregaron anticuerpos anti-CD127 N13B2, MD707-3 y MD707-6 al sobrenadante a 6 µg/ml. Se analizó la expresión de CD80 (A) y CD40 (B) en la superficie celular mediante FACS. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes y están expresados en % de expresión en células de control (medio = sin anticuerpo, con TSLP). Solo N13B2, de los anticuerpos ensayados, no incrementó la expresión en superficie celular de CD40 y CD80 en células tratadas con TSLP.

Figura 8. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de anticuerpo quimérico anti-CD127 humano N13B2 (IgG1 o IgG4). Se incubaron células NK humanas utilizadas como efectoras (E) durante 4 horas con una línea celular BAF/3 transfectada con CD127 humano como células diana (proporción de 10 células efectoras por 1 diana) y con diferentes concentraciones de N13B2 IgG1 quimérico (cuadrado lleno), N13B2-IgG4 (cuadrado vacío) o MD707-3 quimérico (X). El porcentaje de citotoxicidad específica fue determinado mediante liberación de ⁵¹Cr.

Figura 9. Eficacia de los mAbs de rata N13B2 anti-CD127 para mejorar la colitis inducida químicamente en ratones inmunodeficientes humanizados. La supervivencia (A) y el cambio en peso (B) fueron monitoreados diariamente desde el día 0, comienzo del tratamiento químico con ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS), el cual induce una severa inflamación colónica cuando se administra intrarrectalmente, después de inyección de PBS (línea continua/triángulo lleno) o anticuerpo N13B2 anti-IL-7Rα (línea punteada, triángulo vacío). En (B), cada punto representa un dato de peso promedio (±SEM); n=6 para el grupo Hu-TNBS + PBS y n=6 para el grupo TNBS + anti-IL-7Rα. La supervivencia está incrementada y la pérdida de peso está reducida en el grupo tratado.

Figura 10. Secuencias nucleotídica y de aminoácidos de las cadenas VH y VL de la quimera N13B2_G1M. Las cadenas Fc están impresas en minúsculas, las tres CDRs en cada secuencia están subrayadas. Un asterisco (*) designa la ubicación del codón *stop* en la secuencia de aminoácidos.

Figura 11. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la quimera N13B2_G4M. Las cadenas Fc están impresas en minúsculas, las tres CDRs en cada secuencia están

subrayadas. Un asterisco (*) designa la ubicación del codón *stop* en la secuencia de aminoácidos.

Figura 12. Secuencia de aminoácidos de tres cadenas Fc humanas alternativas (IgG1, IgG2 y IgG4) y de la cadena Fc del anticuerpo N13B2 de rata (IgG1).

Figura 13. Ensayo de unión ELISA de anti-CD127: recubrimiento con CD127Fc humano y revelado con un anticuerpo anti-kappa humana. La actividad anti-CD127 del nuevo anticuerpo N13B2 fue medida mediante ensayo ELISA utilizando un antígeno hCD127 recombinante. Se comparó la actividad para CD127 entre diferentes formatos de anticuerpos N13B2 (anticuerpos wt (X), una IgG4 humanizada h1 (cuadrado lleno), h2 (círculo vacío) o h3 (triángulo lleno). DO: densidad óptica

Tabla 4. *ED₅₀ de anticuerpos seleccionados*

	ED ₅₀ (ng/ml)
N13B2 wt	3
N13B2-h1	2,4
N13B2-h2	0,6
N13B2-h3	0,6

Figura 14. Inhibición de P-STAT5 con anticuerpos anti-CD127: A. Inhibición de P-STAT5 inducida por IL-7 mediante mAbs N13B2 humanizados en linfocitos T (N13B2 h1 (cuadrado negro), h2 (círculo abierto) y h3 (triángulo negro) de una manera dependiente de dosis y comparados con anticuerpo de rata N13B2 wt (X) en presencia de 0,1 ng/ml de IL-7 humana recombinante. B. Se compararon diferentes anticuerpos anti-CD127 de generaciones previas de anticuerpos en cuanto a su capacidad de inhibir P-STAT5 dependiente de IL-7: MD707-3 (círculo), MD707-4 (triángulo) y MD707-13 (cuadrado).

Tabla 5. *IC₅₀ de anticuerpos seleccionados*

	IC ₅₀ (ng/ml)
N13B2 wt	50,2
N13B2-h1	63,8
N13B2-h2	18,7
N13B2-h3	21,2

Figura 15. Ensayo de estabilidad de anticuerpos anti-CD127 humanizados versus de rata. Las concentraciones de anticuerpos fueron medidas mediante ELISA después de 7 días a 37°C (N13B2wt de Rata (+) o N13B2 h3 humanizado (cuadrado)) y a -80°C (N13B2wt

de Rata (X) o N13B2 h3 humanizado (triángulo)) y después de cuatro eventos de congelamiento/descongelamiento (rombos).

Tabla 6. *Actividad de unión de los anticuerpos después de 7 días a 37°C o a -80 °C y después de 4 eventos de congelamiento/descongelamiento.*

	ED ₅₀ (ng/ml)
N13B2 wt_almacenado a -80°C	3,6
N13B2 wt_almacenado 7d a 37°C	3,5
N13B2-h3_almacenado a -80°C	1,3
N13B2-h3_almacenado 7d a 37°C	1,1
N13B2-h3_4x congelamiento-descongelamiento	1,7

Tabla 7. *Ensayo de estabilidad de anticuerpos anti CD127 humano humanizados versus de rata. Análisis mediante filtración en gel de formación de agregados después de incubación durante 7 días a 37°C o a -80°C.*

	N13B2-wt		N13B2-h"	
	D7 a -80°C	D7 a 37°C	D7 a -80°C	D7 a 37°C
% agregados	3	4	2,8	3,2
% monómeros	97	96	97,2	96,8

Figura 16. Ensayos de competición e internalización mediante citometría. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica humanas con varios mAbs anti-CD127, durante 30 min tanto a 4°C (barra rayada) como a 37°C (barra negra) o a 37°C durante 30 min sin IL-7 y luego durante 15 min con 5 ng/ml de IL-7 humana recombinante (barra gris): (A) 10 µg de clones MD707-5, MD707-12 o MD707-13 o el N13B2-G4 quimérico; (B) 50 ng de N13B2, HAL clon H3L4 o 1A11 o medio como control. Las células fueron luego teñidas a 4°C con mAbs anti CD127 humano disponibles comercialmente para evaluar la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-7 a nivel de membrana celular.

Los anticuerpos MD707-5, MD707-12 y MD707-13 indujeron la internalización del receptor a 37°C con o sin IL-7, mientras que el N13B2-G4 quimérico no lo hizo. El anticuerpo HAL indujo una disminución en la expresión de CD127 en la superficie celular en cualquier condición. Los resultados a 4°C muestran que el anticuerpo 1A11 compite levemente con el anticuerpo utilizado para marcado, mientras que HAL muestra fuerte competición y N13B2 ninguna

competición. A 37°C, no se observó tñido de la superficie celular en presencia de HAL, mientras que 1A11 solo indujo una fuerte disminuci3n en la expresi3n de CD127 en la superficie celular y cuando est3 combinado con IL-7, la expresi3n en la superficie celular fue disminuida en ~90%. En contraste, N13B2 no redujo la expresi3n de CD127 en la superficie celular a 4°C, ni indujo una disminuci3n en la expresi3n de CD127 en la superficie celular utilizado solo, e inhibi3 la disminuci3n observada en presencia de IL-7.

Figura 17. (A) Estudio farmacocin3tico y de farmacodinamia de la administraci3n de mAbs N13B2 y MD707-13 en primates no humanos. Se trataron babuinos (*Papio anubis*) intravenosamente con 10 mg/kg de N13B2-IgG1 (n=3, cuadrado lleno), N13B2-IgG4 (n=3, c3rculo lleno) o MD707-13-IgG4 (n=3, c3rculo vac3o). Se monitore3 la concentraci3n en suero de mAbs anti-CD127 mediante ELISA. (B). En paralelo, se monitore3 la expresi3n de CD127 en la superficie celular de linfocitos T mediante citometr3a de flujo y se normaliz3 al nivel medido antes de la inyecci3n de mAbs (representado por l3nea punteada). * p<0,05. Los niveles totales en plasma son comparables durante el tiempo para los tres anticuerpos. La expresi3n de CD127 en la superficie celular disminuye despu3s de ~8 d3as despu3s del tratamiento con MD707-13, mientras que no se observa disminuci3n con ninguno de los clones de N13B2 ensayados.

Figura 18. Se trataron intravenosamente babuinos (*Papio anubis*) con 10 mg/kg de N13B2-IgG1 (n=3, cuadrado lleno), N13B2-IgG4 (n=3, c3rculo lleno) o MD707-13-IgG4 (n=3, c3rculo vac3o). Se monitore3 la frecuencia de linfocitos T regulatorios (CD3+ CD4+ CD25high Foxp3+) en sangre y nodos linf3ticos (expresada como % de c3lulas T CD4-positivas) as3 como n3mero de conteo absoluto de linfocitos T regulatorios (expresado en c3lulas/mL) en los d3as 0 y 2 semanas despu3s de la administraci3n de los mAbs. ** p<0,01, *** p<0,001. Los tres anticuerpos aumentan el conteo total en sangre y la proporci3n tanto en sangre como en nodos linf3ticos de c3lulas T regulatorias.

Figura 19. Inhibici3n *in vitro* de la expresi3n de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$. A. Porcentaje de linfocitos T humanos $\alpha 4$ -positivos y $\alpha 4/\beta 7$ -positivos, despu3s de 9 d3as de cultivo con o sin 5 ng/ml de IL-7 humana, ensayados mediante FACS. B. Igual que arriba, con la concentraci3n indicada de mAb N13B2 agregada al cultivo en el d3a 0. Las l3neas punteadas indican el nivel de base en una condici3n de control (sin IL-7 y mAb N13B2). El incremento en la expresi3n de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ inducido por IL-7 es evitado mediante mAb N13B2 humanizado *in vitro* (es completamente inhibido a ~2 μ g/mL de anticuerpo).

Figura 20. Inhibición *in vivo* de la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$. Se inyectaron intraperitonealmente 40×10^6 células mononucleares de sangre periférica humana en ratones inmunodeficientes irradiados (ratón *knockout* para NOD/SCID/cadena gamma del receptor IL-2). Porcentaje de linfocitos T $\beta 7$ -positivos en sangre (izquierda) e injerto de linfocitos T humanos $\beta 7$ -positivos (derecha) después de dos semanas de tratamiento con buffer control (n=5) o mAb N13B2 (5 mg/kg, n=5), evaluado mediante FACS. ** $p < 0,01$. N13B2 reduce significativamente la relación de células T $\beta 7$ -positivas, y el injerto de células T $\beta 7$ -positivas.

Figura 21. Efecto del anticuerpo N13B2 en un modelo DTH, un modelo de psoriasis *in vivo*. Babuinos (*Papio anubis*) vacunados con BCG (Bacillus Calmette-Guerin) fueron desafiados mediante una inyección intradérmica de 2000 (A) o 1000 (B) unidades de tuberculina purificada para inducir una respuesta de hipersensibilidad de tipo demorado y los diámetros de eritema fueron registrados cada día (asterisco, línea punteada). Un mes después, los animales fueron tratados intravenosamente con 10 mg/kg de N13B2-IgG1 (n=3, cuadrado lleno), N13B2-IgG4 (n=3, círculo lleno) o MD707-13-IgG4 (n=3, círculo vacío). Cuatro horas después de la administración de los mAbs, los animales fueron desafiados nuevamente mediante una inyección intradérmica de 2000 (A) o 1000 (B) unidades de tuberculina purificada para inducir una respuesta de hipersensibilidad de tipo demorado y los diámetros de eritema fueron registrados cada día (líneas continuas). El anticuerpo N13B2 pero no el MD707-13, inhibe la respuesta de linfocitos de memoria, como se mide mediante el diámetro del eritema después del segundo desafío.

Figura 22. Se trataron babuinos (*Papio anubis*) intravenosamente con 10 mg/kg de N13B2-IgG1 (n=3, cuadrado lleno), N13B2-IgG4 (n=3, círculo lleno) o MD707-13-IgG4 (n=3, círculo vacío) o buffer control (n=3, línea punteada). Cuatro horas más tarde, los animales recibieron una inyección intravenosa de 1,5 ml de glóbulos rojos de oveja (SRBC, por sus siglas en inglés) al 10%. Los títulos de IgG específicas anti-SRBC fueron monitoreados 1 semana y 2 semanas después de la administración de SRBC y se normalizaron a sus títulos al día 0. * $p < 0,05$. N13B2, pero no MD707-13, inhibe la respuesta inmune humoral, como se mide mediante el título de IgG específica.

Figura 23. Secuencia de proteínas de VH de IgG4 S228P_h3 de N13B2 humanizado: la secuencia en gris son las CDRs, los aminoácidos subrayados y en negrita están mutados (V42I, A54S, D82N, M108L), la secuencia subrayada es la secuencia de IgG4 mutada (S228P).

Figura 24. Secuencia de proteínas de VL de Ckappa_h3 de N13B2 humanizado: la secuencia en gris son las CDRs, los aminoácidos subrayados y en negrita están mutados (V54I, Y77F, F93Y+ N31Q, S59T), la secuencia subrayada es la secuencia de IgG4 mutada (S228P).

Figura 25. N13B2 protege de la muerte en un modelo inflamatorio de ratón: se indujo una enfermedad injerto-versus-hospedante en ratones humanizados (ver Ejemplo 13). Porcentaje de ratones NSG sobrevivientes inyectados con 50 millones de PBMC humanas en el día 0 que no recibieron tratamiento (cuadrado blanco, n=14) o tratados tres veces por semana mediante inyección intraperitoneal con 5 mg/kg de N13B2 quimérico (círculo negro, n=19).

Figura 26. N13B2 previene específicamente la inflamación de colon en el modelo inflamatorio de ratón (ver Ejemplo 13). En el momento de la eutanasia (es decir con pérdida del 25% del peso o a los 100 días después de la inyección), se analizaron mediante histología los infiltrados celulares inflamatorios en cada tejido de ratones NSG inyectados con 50 millones de PBMC humanas en el día 0 y tratados (negro) o no tratados (blanco) tres veces por semana con 5 mg/kg de N13B2, sobre portaobjetos de 10 µm teñidos con hematoxilina y eosina. Los resultados se presentan como sigue: A. Colon, B. Intestino, C. Hígado y D. Pulmón. Los datos son la media ± SEM de al menos n=8 por grupo.

Figura 27. Dominios de epítopes sobre proteína CD127 (Uniprot P16871) que son reconocidos por el anticuerpo N13B2. Los aminoácidos en **negrita** corresponden a las secuencias que forman el epítipo conformacional reconocido por N13B2; los aminoácidos con fondo gris son importantes para interacción con IL-7; los aminoácidos que están tachados constituyen el péptido señal de CD127.

Figura 28. Estudio de co-inmunoprecipitación del complejo CD127/IL-7/CD132 con anticuerpos anti-hCD127 (Ejemplo 21). Calles: 1- PBL solo, 2- PBL+IL-7, 3- PBL+IL-7+N13B2, 4- PBL+IL-7+MD707-13, 5- CD132-Fc (72 Kda) o CD-127-Fc (80KDa). Co-inmunoprecipitación de muestras en columna anti-hCD127 (MD707-9). Los eluatos fueron analizados mediante Western-blot con (A) anticuerpo anti-CD132 humano de conejo revelado con anticuerpo anti-conejo de cabra marcado con peroxidasa o con (B) anticuerpo anti-CD127 humano de rata y revelado con anticuerpo anti-rata de asno marcado con peroxidasa.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación y selección de novedosos mAbs anti-CD127 humano

[00157] Se inmunizaron ratas con hCD127-Ig recombinante (hCD127 fusionado con un fragmento constante de una inmunoglobulina - Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H03H) y se derivaron anticuerpos monoclonales de acuerdo con técnicas convencionales. El protocolo de inmunización utilizado fue el siguiente: se utilizó CD127 Fc Chimera recombinante (10975-H03H Sino Biological, Beijing, China) para inmunizar ratas de la cepa LOU/C Igk1a. Se suspendieron cincuenta microgramos de proteínas en Adyuvante Completo de Freund y se administraron s.c. Después de 20 días se llevó a cabo una inyección de refuerzo de la proteína suspendida en Adyuvante de Freund Incompleto. Otra inyección similar de refuerzo se llevó a cabo en el día 60 y una inyección de refuerzo se llevó a cabo en el día 90 con 100 microgramos de proteínas, 4 días antes de la recolección de células del bazo.

[00158] Se obtuvieron hibridomas mediante fusión de células mononucleares del bazo con el inmunocitoma IR983F de rata LOU, una línea celular no secretora y resistente a azaguanina, de acuerdo con un procedimiento previamente descrito (Chassoux et al, 1988). Los hibridomas fueron primeramente relevados de acuerdo con la capacidad de los anticuerpos monoclonales secretados de unirse a la molécula de CD127 recombinante (CD127 Fc Chimera; 10975-H03H, Sino Biological, Beijing, China).

[00159] Después de la selección, se cultivaron los hibridomas en medio DMEM completo. El sobrenadante fue concentrado mediante ultrafiltración (Centramate, Pall) y purificado por afinidad sobre cromatografía de Proteína G (HiTrap, GeHealthcare). La elución fue llevada a cabo con buffer de elución con glicina 0,1M de pH 2,8. Las inmunoglobulinas purificadas resultantes fueron evaluadas en un ensayo de ELISA de actividad contra CD127 humano.

[00160] Entre los primeros clones seleccionados en base al reconocimiento por anticuerpos secretados de CD127 recombinante, 2 fueron seleccionados además mediante citometría de flujo sobre el reconocimiento de CD127 expresado por células T humanas y sobre sus propiedades antagonistas con respecto a TSLP.

[00161] Se produjeron anticuerpos y se caracterizaron sus isotipos así como sus afinidades mediante medición de Resonancia de Plasmones Superficiales utilizando tecnología BIAcore.

Ejemplo 2. Reconocimiento de rCD127 de mAbs anti-h-CD127 evaluado por ELISA

[00162] Se inmovilizó hCD127 recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H08H) sobre plástico y se agregaron dosis crecientes de mAbs para medir la unión.

Después de incubación y lavado, se agregó la cadena kappa de ratón anti-rata (AbdSerotec) marcada con peroxidasa y se reveló con métodos convencionales. La unión fue confirmada para cada anticuerpo.

Ejemplo 3. Inhibición de la señalización de IL-7 (pSTAT5)

[00163] Células monocíticas de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) cosechadas mediante gradiente de Ficoll a partir de voluntarios saludables fueron incubadas en medio libre de suero con diferente concentración de anticuerpos de interés durante 15 minutos a temperatura ambiente, antes de incubación con 0,1 o 5 ng/ml de IL-7 humana recombinante (rhIL-7; AbD Serotec ref PHP046) durante 15 minutos a 37°C. Las PBMC no tratadas con rhIL-7 fueron analizadas como señal de fondo, mientras que células tratadas con IL-7 sin anticuerpo fueron configuradas como control negativo. Las PBMC fueron entonces rápidamente enfriadas y lavadas con buffer FACS para detener la reacción. Las células fueron incubadas durante 15 minutos con solución Cytofix/Cytoperm fría (BD Bioscience, ref 554722), lavadas dos veces con buffer Perm/Wash (Bd Bioscience) y teñidas con un anticuerpo FITC anti-CD3 humana (Bd Bioscience ref 557694) durante 30 minutos sobre hielo. Las PBMC fueron luego lavadas dos veces con buffer Perm/Wash y permeabilizadas en BD Perm Buffer III (Bd Bioscience, ref 558050) durante 30 minutos. Las células fueron luego lavadas dos veces con buffer FACS (y/o PBS con BSA 1% y azida 0,1%) e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo anti-pSTAT5 humano Alexa 647 (BD Bioscience, ref 612599). Las muestras fueron analizadas en un instrumento FACS BD CANTO II. Como se muestra en la Figura 1 y Figura 2, N13B2 y anticuerpos quiméricos derivados del mismo (N13B2-G1 y N13B2-G4) son fuertes inhibidores de la fosforilación de STAT5, con más de 50% de inhibición a concentraciones tan bajas como 50 ng/ml y más de 80% (para 0,1 ng/ml de IL-7) o más de 90% (para 5 ng/ml de IL-7) de inhibición a concentraciones de anticuerpo tan bajas como 100 ng/ml.

Ejemplo 4. La concentración inhibitoria media (IC₅₀) de diferentes anticuerpos monoclonales anti-IL-7R α humana se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. *IC₅₀ de diferentes anticuerpos anti-CD127 sobre P-STAT5 inducidas por 100 pg/ml de rhIL-7*

IC ₅₀	N13B2	N13E5	N13K12	MD707-3	N13B2-G1	N13B2-G4
pg/ml	43	50	62	1090	28	37

Ejemplo 5. Prueba de internalización de IL-7R mediante citofluorometría

[00164] La prueba de internalización puede ser llevada a cabo usando un microscopio confocal como se detalla en los materiales y métodos de Henriques et al (2010) y Luo et al. (2011). Para observar la internalización de CD127 en ausencia de IL-7, se incubaron anticuerpos hN13B2, HAL clon H3L4 (Patente US 8.637.27) o 1A11 (solicitud internacional de patente WO 2011/094259) a una concentración final de 50 ng/ml (o anticuerpos MD707-5, MD707-12, MD707-13 o N13B2-G4 a una concentración final de 10 µg/ml, con PBMC humanas (100000 células por pocillo) en medio libre de suero (TexMACS, Miltenyi Biotec) durante 30 min a 4°C o 37°C. Para observar la internalización del CD127 en ausencia de IL-7, se utilizaron las mismas condiciones de pre-incubación a 37°C con anticuerpos y las células fueron luego estimuladas con IL-7 recombinante (AbD Serotec, ref PHP046) a 0,1 ng/ml durante 15 min a 37°C. La reacción se detuvo a 4°C, y las células se lavaron 3 veces con PBS-BSA 1%-azida 0,1% antes de teñir con anti-CD127 (clon hIL-7R-M21, BD Bioscience, ref 557938) marcado con PE diluido a 1/10 en PBS-BSA 1%-azida 0,1% y se incubaron durante 15 min a 4°C. Luego del lavado, las células se analizaron por citofluorometría con un citómetro Cantoll (BD Biosciences). Los resultados presentados en la Figura 16 son representativos de tres experimentos independientes.

[00165] Este método es fácilmente adaptable en placas de 96 pocillos con el fin de llevar a cabo un relevamiento y para seleccionar anticuerpos que bloquean la internalización de CD127 dependiente o independiente de IL-7.

Ejemplo 6. Estudio de afinidad del anticuerpo anti-CD127

[00166] La afinidad del anticuerpo anti hCD127 se midió por resonancia de plasmones superficiales en un Biacore 3000 (GE Healthcare).

[00167] Un chip CM5 (GE Healthcare) se activó mediante inyección de una mezcla de NHS/EDC durante 7 min. Se inyectó CD-127Fc (500 µg/mL) diluido en 5 mM de buffer maleato pH 6,2 y los residuos éster de succinimida hasta una señal de 300 UR en gancho. Los residuos de reactivos libres se inactivaron mediante la inyección de etanolamina 1M pH 8,5. Se inyectaron los anticuerpos sobre el CD127 inmovilizado en el rango de concentración especificado en la sección de resultados. La tasa de inyección se estableció en 40 µL/min, la asociación se midió durante 3 min y la disociación durante 10 min. Entre cada ciclo del análisis, el chip fue regenerado por inyección de una solución de MgCl₂ 5M durante 60s.

[00168] Los sensorgramas obtenidos fueron analizados con un modelo de “*Bivalent Analyte*” con el software BIAeval 4.

[00169] Como se muestra en la Figura 3 y en la Tabla 2 en ella, el N13B2 de rata y quimerizado presentó alta afinidad por CD127, con una KD en el rango de 4,9E-11M – 8E-11 M

(N13B2 de rata), $3,77\text{E}-10$ M (N13B2-Gi) y $1,70\text{E}-10$ (N13B2-G4). El anticuerpo de rata MD707-1 mostró una afinidad menor por CD127 que el N13B2 de rata.

Ejemplo 7. Actividad de unión del anticuerpo anti-CD127

[00170] Para ELISA *sandwich*, se recubrió una placa de 96 pocillos con anticuerpo de burro anti-IgG humana (Fc-específico) a $1,2\text{ }\mu\text{g/ml}$ y se agregaron los anticuerpos purificados para medir la concentración en función del rango estándar. Luego de la incubación y lavado, se agregaron anticuerpos de ratón anti-cadena liviana humana, kappa-específico (Abcam, referencia ab79115 o Effimune, clon NaM76-5F3) más anticuerpo anti-ratón de asno marcado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, referencia 715-036-151) y se revelaron mediante métodos convencionales.

[00171] La actividad de unión del anticuerpo anti-hCD127 se evaluó mediante ELISA (por sus siglas en inglés, Ensayo de Inmunosorción Ligado a Enzima). Para el ensayo ELISA, se inmovilizó hCD127 recombinante sobre plástico a $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ y se agregó el anticuerpo purificado para medir la unión. Luego de incubación y lavado, se agregó anticuerpo de ratón anti-cadena kappa de rata marcado con peroxidasa (AbdSerotec) y se reveló mediante métodos convencionales.

[00172] Como se muestra en la Figura 4 y en la Tabla 3, la actividad de unión medida por ELISA del anticuerpo N13B2 es elevada, con un $\text{ED}_{50} = 65,6\text{ ng/mL}$ ($\text{ED}_{50} < 75\text{ ng/ml}$ y $\text{ED}_{50} < 100\text{ ng/ml}$) para el anticuerpo de rata anti-hCD127 N13B2 y un ED_{50} de $12,0\text{ ng/ml}$ y $12,6\text{ ng/ml}$ ($\text{ED}_{50} < 15\text{ ng/ml}$) para dos anticuerpos quiméricos derivados de N13B2 (cN13B2-G1 y cN13B2-G4).

Ejemplo 8. Ensayo de estabilidad

[00173] N13B2-G1 purificado humanizado y quimérico fue incubado a 37°C o a -80°C durante 7 días. Se usaron dos ensayos para medir la estabilidad del anticuerpo: unión de anti-CD127 por ensayo ELISA, y formación de agregados por filtración en gel. Para el ensayo ELISA de actividad, se inmovilizó sobre plástico hCD127 recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H08H) a $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ y se agregaron diluciones de sobrenadante para medir la unión. Luego de la incubación y el lavado, se agregaron anticuerpo de ratón anti-cadena liviana humana (kappa-específico) más anticuerpo de asno anti-ratón marcados con peroxidasa y se reveló mediante métodos convencionales. Para análisis de la formación de agregados, se analizó la muestra sobre columna de cromatografía por filtración en gel (Superdex 200, 10/300GL, GeHealthcare) para separar y evaluar el agregado y monómero de las muestras.

Ejemplo 9. Producción de TARC inducida por TSLP y expresión de los marcadores de células dendríticas maduras CD80 y CD40.

[00174] Células dendríticas (CD) mieloides fueron aisladas con el kit de aislamiento de células Dendríticas CD1c (BDCA-1)+ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) a partir de sangre de voluntarios saludables (Etablissement Français du Sang, Nantes, Francia). Células dendríticas mieloides fueron cultivadas en RPMI que contenía suero fetal bovino 10%, piruvato 1%, Hepes 1%, L-glutamina 1% y penicilina-estreptomicina 1%. Se sembraron las células a $5 \cdot 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos planas, en presencia de TSLP (15 ng/ml), LPS (1 µg/ml) o medio de cultivo solo, y se agregaron anticuerpos de rata anti-CD127 humano a diferentes concentraciones. A las 24 horas de cultivo, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo para el marcador de superficie de maduración CD80 (anti-CD80-V450 (BD#560442) y se recolectaron los sobrenadantes y se los analizó en cuanto a la producción de TARC por ensayo ELISA (R&D systems, Minneapolis , EE.UU.).

[00175] La inhibición de producción de TARC inducida por TSLP se evaluó midiendo dicha producción tal como se describió anteriormente en la ausencia de anticuerpo o en presencia de N13B2 o MD707-6 o anticuerpo anti-TSLPR comercial (R&D Systems ref. AF981) a 1 µg/ml o 6 µg/ml. Como se muestra en la Figura 6, N13B2 inhibió la producción de TARC inducida por TSLP en más del 25% en concentraciones tan bajas como 1 µg/mL, esto es, tan eficientemente como MD707-6 a esta concentración.

[00176] La inhibición de producción de los marcadores de superficie celular CD40 y CD80 inducida por TSLP se evaluó midiendo dicha expresión tal como se describió anteriormente (para CD40, se usó anticuerpo (anti-CD40-FITC de Beckton Dickinson ref. 555588) en condiciones similares a las descritas anteriormente para CD80) en ausencia de anticuerpo (expresión normalizada a 100% para esta condición) o en presencia de los anticuerpos N13B2, MD707-3 o MD707-6 a 6 µg/ml. Como se muestra en la Figura 7, ambos MD707-3 y MD707-6 indujeron un incremento de la expresión de CD40 y CD80, mientras que MD707-3 es un buen inhibidor de la activación de STAT5 y un buen ligante a CD127 (Figura 2 y) y MD707-6 es un fuerte inhibidor de la producción de TARC inducida por TSLP (Figura 6). El incremento fue de la menos 20% para CD80 y 50% para CD40. En contraste, el anticuerpo de la invención, N13B2, no incrementó la producción de CD40 o CD80 inducida por TSLP. En cambio, dichas expresiones fueron inferiores en presencia de TSLP y anticuerpo que en presencia de TSLP sola.

Ejemplo 10. Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo (ADCC) de mAbs anti-CD127 humano

[00177] ADCC se refiere a la unión de un anticuerpo a un epítipo expresado en células diana y el reclutamiento dependiente de Fc subsiguiente de células inmunes efectoras que expresan receptores de Fc (esencialmente células NK y linfocitos activados), lo que da por resultado la muerte de las células diana principalmente por mecanismos basados en granzima/perforina.

[00178] Las células efectoras fueron células NK humanas primarias frescas aisladas de células mononucleares de sangre periférica mediante selección negativa utilizando perlas magnéticas (kit de aislamiento de NK, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y un instrumento de selección de células AutoMACS. Células NK fueron incubadas durante la noche a 37°C, CO₂ 5%, en Medio RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, California) complementado con FBS 10% (Life Technologies), penicilina 100 UI/ml (Life Technologies), estreptomicina 0,1 mg/ml (Life Technologies), L-glutamina 2 mM (Life Technologies) y 150 UI/ml de IL-2 humana (Roche, Basilea, Suiza). Las células diana (una línea celular humana BAF/3 transfectada con CD127 (Park et al., 2000)) fueron marcadas con 100 µCi (3,7 MBq) de ⁵¹Cr (PerkinElmer) durante 1 h a 37°C y se las lavó cinco veces con medio de cultivo. Las células diana fueron incubadas con anticuerpos diluidos o con excipiente (medio de cultivo) durante 15 min a temperatura ambiente y se colocaron 10.000 células en una placa de 96 pocillos de fondo redondeado. Se agregaron células T efectoras en una proporción de células de 10:1 (volumen final: 200 µl) para un período de incubación de 4 horas a 37°C. Luego se cosechó un total de 25 µl del sobrenadante y se contó en un contador gamma (Packard Instrument).

[00179] Ambos mAbs MD707-3 provenientes de rata y N13B2-G1 quimérico (teniendo así un dominio Fc tipo IgG1) desencadenaron una ADCC. El N13B2-G4 quimérico (que tenía un dominio Fc tipo IgG4) no mostró ninguna actividad ADCC y se usó como control negativo. De manera interesante, no hay una correlación directa entre las propiedades de afinidad, unión y ADCC, lo que indica que las propiedades de ADCC no podrían predecirse a partir de los análisis de unión.

Ejemplo 11. Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de mAbs anti-CD127 humano

[00180] Las regiones VH y VL del clon N13B2 fueron secuenciadas usando la tecnología PCR RACE. Brevemente, se extrajo el ARN total, se lo transcribió inversamente y el ADNc resultante fue poliadenilado en el extremo 3' de las moléculas usando dATP y la enzima transferasa terminal. Una primera reacción PCR de 35 ciclos se llevó a cabo usando un cebador ancla oligodT y enzima Herculeasa (Stratagene). Se llevó a cabo una segunda PCR de 35 ciclos usando cebadores ancla anidados. El producto de PCR resultante fue entonces

clonado mediante TA en *E. coli* y luego de selección con ampicilina, las colonias resultantes fueron relevadas por caracterización con enzima de restricción y se secuenció el ADNc insertado.

Ejemplo 12. Humanización

[00181] La humanización del anticuerpo monoclonal de rata N13B2 se logró usando la tecnología de injerto de CDR estándar. El principio de este método es reformar un anticuerpo humano de modo que contenga sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del anticuerpo monoclonal de rata de modo de no sólo reducir la inmunogenicidad del anticuerpo en humanos sino también de conseguir propiedades biofísicas mejoradas de la molécula con CDRs injertadas.

[00182] La humanización mediante injerto de CDR requiere que los residuos de unión a antígeno del anticuerpo parental de rata sean retenidos en la versión humanizada. Se ha hallado que los residuos adyacentes a las CDRs, denominados residuos “Vernier”, afectan la conformación de las CDRs y llevan a cabo la sintonía fina del reconocimiento del antígeno. Chothia y Lesk, (1987) segregaron las conformaciones de CDR de acuerdo con residuos “canónicos”, algunos de los cuales están ubicados dentro de las CDRs mismas, otros en las regiones de estructura. La identificación de estos residuos “Vernier” y “canónicos” es por lo tanto un paso crítico. El protocolo usado se basa en la estrategia que primero utilizó Greg Winter y colaboradores (Paus y Winter, 2006) en el Medical Research Council, Cambridge, RU y usa residuos de CDR definidos mediante Kabat.

[00183] La selección de las regiones de estructura humanas aceptoras sobre las cuales las regiones CDR del N13B2 de rata son injertadas se consiguió buscando en la base de datos IMGT de genes V de rata y humanos usando IgBLAST –una herramienta desarrollada en el NCBI para facilitar el análisis de las secuencias de la región variable de las inmunoglobulinas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast> ; Ye et al., 2013) con las secuencias VH y VL de N13B2 de rata como datos iniciales. Además, la estrategia aplicada aquí usa secuencias de línea germinal humana que son secuencias naturales humanas que no contienen las hipermutaciones somáticas encontradas en la proteína y las secuencias derivadas de ADNc. Normalmente se seleccionaron los genes de línea germinal más similares a las secuencias de VL y VH de rata. Las regiones VH y VL de la estructura aceptora de la línea celular humana fueron identificadas mediante alineamiento de secuencias VH y VL del anticuerpo parental N13B2 y se basó en los siguientes criterios: 1. Identidad de secuencia a través de las estructuras y CDRs como fueron definidas por Kabat, 2. Residuos de interface inter-cadena idénticos y compatibles, 3. Bucles soporte con las conformaciones de la CDR parental canónica y los residuos Vernier.

[00184] Se probaron unas pocas secuencias de humanización diferentes para N13B2 para elegir la mejor, lo que mantiene la unión y la actividad biológica. Para variantes de humanización de N13B2, se clonó la secuencia variable de la cadena pesada (VH) humanizada del anticuerpo N13B2 mediante EcoRV en el plásmido de expresión pFuseCHlg-hG1e4 (Invivogen, Toulouse) que contiene los dominios CH1-CH2-CH3 de hlgG1, mutados en E333A para incrementar la ADCC. La secuencia variable de la cadena liviana (VL) humanizada del anticuerpo N13B2 fue clonada mediante BsiWI en el plásmido de expresión pFuse2CLlg-hk (Invivogen, Toulouse) que contiene CLkappa.

[00185] En células COS, hemos co-transfectado, mediante el método de lipofectamina, el plásmido que contenía VH-hFcG1 con el plásmido que contenía VL-CLk. Luego de 48-72h de incubación, el sobrenadante fue recobrado y purificado por afinidad por cromatografía de Proteína G (HiTrap, GE Healthcare) con buffer elución de glicina 0,1M pH 2,8. Los anticuerpos purificados fueron dializados en PBS y concentrados. Fueron cuantificados mediante ELISA *sándwich* y evaluados en una prueba de actividad contra el antígeno CD127.

Ejemplo 13. Estudio de anticuerpos anti-IL-7R α sobre IL-7 en diferentes modelos de enfermedad inflamatoria *in vivo*

[00186] Con el fin de examinar el efecto de un anticuerpo antagonista en la inducción de colitis en ratones NSG humanizados, llevamos a cabo una serie de experimentos en el modelo TNBS, el cual ha mostrado un efecto medible. El uso de haptenos tales como el TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobencen sulfónico) permite inducir una imitación de modelo inmunológico (Nancey et al., 2008). La colitis se induce en ratones mediante la administración intrarrectal de TNBS (Sigma Chemical, L'Isle d'Abeau Chesne, Francia) disuelto en etanol en el día 0 en cuatro ratones humanizados. Inicialmente, los ratones son anestesiados por inhalación de una mezcla de gases. En el día 7, los animales fueron sacrificados bajo anestesia por intoxicación con CO₂ para varios estudios (datos no mostrados). Algunos animales fueron sacrificados antes del día 7 debido a su mala puntuación clínica.

[00187] Dos nuevos grupos de ratones fueron por lo tanto tratados ya sea con PBS o con inyecciones de 210 μ L a 0,7 mg/mL de un N13B2 anti-IL-7R α cada 2 días comenzando el día anterior al tratamiento con TNBS. Se llevaron a cabo análisis similares a los realizados en el desarrollo del modelo.

[00188] Luego ensayamos la eficacia del anticuerpo N13B2 en un modelo murino humanizado de enfermedad injerto-versus-hospedante (*graft-versus-host-disease*, GVHD). Este modelo imita una enfermedad inflamatoria global. Algunos ratones NOD/scid/IL-2R γ ^{-/-} (NSG) (Charles River, L'arbrèsle, Francia) de 7 a 12 semanas fueron irradiados (3Gy) e infundidos intraperitonealmente (i.p.) con 50 millones de PBMC humanas de donantes sanos

como describieron previamente Poirier et al., 2012. Los animales fueron luego mantenidos en condiciones asépticas y se monitoreó tres veces por semana la evolución del peso y la evaluación clínica. Un grupo control fue dejado sin tratar luego de la infusión de células y un grupo de tratamiento recibió, desde el día 0 y tres veces por semana, inyecciones i.p. de 5 mg/Kg de mAb N13B2 quimérico. Se diagnosticó GVHD a un ratón frente a una pérdida de 20% del peso corporal. Los animales que tuvieron más de un 25% de pérdida de peso, y los animales que sobrevivieron luego de 100 días desde el día 0 fueron sometidos a eutanasia. Luego de la eutanasia, los tejidos del colon, intestino, hígado y pulmón fueron congelados en nitrógeno líquido y Tissu-tek para análisis histológico. Secciones congeladas (10 µm) de estos tejidos fueron secadas con aire a temperatura ambiente durante 1h antes de fijación con acetona por 10 min a temperatura ambiente y luego se los tiñó con una solución de hematoxilina y eosina. Los resultados se presentan en la Figura 25 y Figura 26.

Ejemplo 14. Análisis de varios parámetros clínicos

[00189] Sobrevida (Figura 9A): evaluamos la tasa de sobrevida de acuerdo al tratamiento químico y el uso del anticuerpo anti-IL-7R α . El porcentaje de sobrevida tiende a ser más importante para el grupo Hu-TNBS + IL-7R α que para el grupo Hu-TNBS + PBS (Figura 9A). De hecho, observamos que el 100% de los ratones del grupo Hu-TNBS + IL-7R α sobrevive hasta 5 días mientras que en el grupo Hu-TNBS + PBS, tres animales tuvieron que ser sometidos a eutanasia antes del D5.

[00190] Peso (Figura 9B): en los grupos tratados con TNBS desde el día 0 de la inyección intrarrectal de TNBS 5%/etanol 50%, observamos una disminución del peso de hasta 20% para ambos grupos. Sin embargo, en el grupo Hu-TNBS + IL-7R α , los animales ganaron peso desde el D3 mientras que en el grupo Hu-TNBS + PBS, la pérdida de peso continuó (Figura 9B). Es importante notar que los ratones tuvieron que ser sacrificados para recolectar datos biológicos y un protocolo en un plazo mayor confirmaría la recuperación de peso.

[00191] Sobrevida (Figura 25): evaluamos la tasa de sobrevida de acuerdo a la inyección de PBMC humanas (GvHD Development) y el uso del anticuerpo N13B2 anti-IL-7R α . La tasa de animales que sobreviven es 30% mejor cuando los animales son tratados con anticuerpo que en los animales control (tasa de mortalidad del 100% de los animales control luego de 60 días). Estos resultados muestran que el anticuerpo N13B2 protege contra GvHD y la muerte.

[00192] Infiltrado de tejidos (Figura 26): colon, intestino, hígado y pulmón de animales muertos y sobrevivientes (pero sometidos a eutanasia) tratados o no fueron analizados histológicamente en cuanto a su tasa de infiltración de células inflamatorias (se determinó la puntuación histológica). Observamos que el colon del animal tratado con N13B2 contenía

menos infiltrado celular que el control. No se observaron diferencias en el intestino, hígado y pulmón entre ambas condiciones.

[00193] Los animales tratados con N13B2 mostraron una tasa de supervivencia del 30% en comparación con el control. El infiltrado celular que caracteriza la inflamación no se modifica por el tratamiento en los tejidos del intestino, hígado y pulmón mostrando que en este modelo de inflamación el N13B2 no protege contra la inflamación en estos tejidos. Sin embargo, N13B2 indujo una disminución del 50% del infiltrado celular en el colon. Este efecto podría correlacionarse con la actividad del anticuerpo N13B2 en la expresión de la integrina $\alpha 4\beta 7$ como se presenta en la Figuras 19 y 20. De hecho, se sabe que la integrina $\alpha 4\beta 7$ juega un rol importante en el alojamiento de los linfocitos activados en el intestino. Por lo tanto la disminución de la expresión de la integrina inducida por el anticuerpo N13B2 puede ser responsable de la disminución del infiltrado celular observada en el colon (Figura 26). Debe enfatizarse que la aparente ausencia de protección en otros tejidos podría ser específica del modelo usado aquí, y no debería conducir a la conclusión de que el efecto protector del anticuerpo está limitado al colon. En particular, la supervivencia mucho mayor de los animales tratados muestra que el efecto protector del anticuerpo tiene un fuerte impacto positivo en la condición general de los animales.

Ejemplo 15. Eficiencia *In vivo* del anticuerpo CD127 no internalizado

Animales

[00194] Babuinos (*Papio anubis*, del Centro de Primatología del CNRS, Rousset, Francia), fueron negativos para todas las pruebas de cuarentena, incluyendo una prueba cutánea de tuberculina. Los animales fueron alojados en las grandes instalaciones para animales de nuestro laboratorio siguiendo las recomendaciones de la Guía Ética Institucional del Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Francia. Todos los experimentos fueron realizados bajo anestesia general con Zoletil (Virbac, Carron, Francia). Los estudios de farmacocinética y farmacodinamia se llevaron a cabo durante los experimentos DTH en cinco babuinos que habían recibido un bolo i.v. de ya sea 10 mg/kg de N13B2-IgG1 o N13B2-IgG4 o MD707-13-IgG4.

Vacunación BCG y ensayo DTH

[00195] De acuerdo con Poirier et al, (Poirier et al., 2011), los babuinos fueron inmunizados intradermalmente (i.d.) dos veces con una vacuna bacillus Calmette-Guérin (BCG) (0.1 ml; 2–8 $\times$ 10⁵ UFS; Sanofi Pasteur MSD, Lyon, Francia) en la región superior de la pierna, 4 y 2 semanas antes de la prueba cutánea DTH. Para investigar la inmunidad de células T antígeno-específica antes de la prueba cutánea DTH se confirmó la inmunización exitosa

mediante ensayo *immunospot* de interferón (IFN)- γ ligado a enzima (ELISPOT) (kit de IFN- γ primate no humano ELISPOT; R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) sobre PBMC recién aisladas, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las reacciones intradérmicas (IDR) se llevaron a cabo con inyecciones duplicadas de dos dosis (1000 UI o 2000 UI) de derivado de proteína purificada-tuberculina (PPD; Symbiotics Corporation, San Diego, CA, EEUU) en 0,1 ml en la piel del lado derecho del lomo de los animales. Se usó solución fisiológica (0,1 ml) como control negativo. Las respuestas dérmicas en los sitios de inyección se midieron usando un calibre. El diámetro de cada eritema indurado fue medido por dos observadores desde los días 3-8, y se consideraron positivos cuando fueron > 4 mm de diámetro. Se registró la media de la lectura. Se llevaron a cabo biopsias de piel de los sitios DTH o control (solución fisiológica) en el día 4 en un duplicado y se colocaron en Tissue Tek Optimal Cutting Temperature Compound (Compuesto OCT) (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, Francia) para análisis inmunohistoquímico. Una segunda IDR se llevó a cabo luego de un período de lavado de 3 días y los animales recibieron una inyección i.v. cada uno de 10 mg/kg de anticuerpos CD127 quiméricos (N13B2-IgG1 o N13B2-IgG4 o MD707-13-IgG4) 1 día antes de este segundo desafío con PPD. Una tercera IDR se llevó a cabo luego de un período de lavado adicional de 3-6 semanas y los animales fueron dejados sin tratar. En algunos casos, una cuarta IDR se llevó a cabo luego de otro período de lavado de 3 meses y los animales también fueron dejados sin tratar.

Ejemplo 16. Expresión de $\alpha\beta 7$ en la superficie de células T *in vitro* e *in vivo* en modelo murino:

[00196] Para medir la expresión de $\alpha\beta 7$ inducida por IL-7 en la superficie de las células T, se estimularon linfocitos T humanos durante 9 días a 37°C, con IL-7 (AbD Serotec, ref PHP046) a 5 ng/ml. La reacción se detuvo a 4°C, y se lavó antes de teñir con anti- $\alpha 4$ marcado con PerCP/Cy5 (BD Bioscience 563644 clon 9F10) y anti- $\beta 7$ marcado con PE (BD Bioscience, clon FIB504). Se midieron mediante citometría de flujo las células positivas en cuanto a integrina $\alpha 4$ y luego las células $\beta 7$ -positivas. El anticuerpo humanizado N13B2 se agregó en el día 0 al cultivo celular a diferentes concentraciones desde 0,01 a 20 ug/ml.

[00197] *In vivo*, 40×10^6 células mononucleares de sangre periférica humana se inyectaron intraperitonealmente en ratones inmunodeficientes irradiados (ratones *knockout* para NOD/SCID/cadena gamma del receptor de IL2). Dos semanas después del tratamiento con buffer control (n=5) o con mAb N13B2 (5 mg/kg, n=5), el porcentaje de linfocitos T $\beta 7$ -positivos en la sangre se midió mediante citometría de flujo y el injerto de linfocitos T-positivos se midió mediante citometría de flujo. Este injerto se midió por citometría de flujo discriminando las células positivas para CD45 humano de las células positivas para CD45 de ratón utilizando anticuerpos específicos (anti-CD45 humano PECy7 de BD referencia 57748 y anti-CD45 de

ratón PerCPCy5.5 de BD referencia 550994) luego se analizaron las células positivas para $\beta 7$ humana (BD Bioscience, clon FIB504).

Ejemplo 17. Evaluación de perfiles de anticuerpo usando *microarrays* de péptidos

[00198] Los *microarrays* de péptidos PepStar™ de Peptide Technologies comprenden péptidos sintéticos purificados derivados de antígenos u otras fuentes que están inmovilizados quimioselectivamente y covalentemente sobre una superficie de vidrio. Una fracción molecular enlazadora hidrófila optimizada está inserta entre la superficie de vidrio y la secuencia del péptido derivado de antígeno para evitar falsos negativos causados por impedimentos estéricos. Por razones técnicas todos los péptidos contienen una glicina C-terminal. Los experimentos de evaluación de perfiles de las muestras se llevaron a cabo sobre una biblioteca de péptidos que consistía de 52 péptidos. La lista completa de los péptidos se muestra a continuación:

Tabla 9. *Lista de péptidos usados en los ensayos de microarrays de péptidos*

SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
58	ESGYAQNGDLEDAEL	76	FIETKKFLLIGKSNI	94	HDVAYRQEKDENKWT
59	AQNGDLEDAELDDYS	77	KKFLLIGKSNICVKV	95	YRQEKDENKWITHVNL
60	DLEDAELDDYSFSCY	78	LIGKSNICVKVGEKS	96	KDENKWITHVNLSSTK
61	AELDDYSFSCYSQLE	79	SNICVKVGEKSLTCK	97	KWITHVNLSSSTKLTL
62	DYSFSCYSQLEVNGS	80	VKVGEKSLTCKKIDL	98	VNLSSSTKLTLQRL
63	SCYSQLEVNGSQHSL	81	EKSLTCKKIDLTITV	99	STKLTLQRLQPA
64	QLEVNGSQHSLTCA	82	TCKKIDLTITVKPEA	100	TLQRLQPAAMYEI
65	NGSQHSLTCAFEDPD	83	IDLTITVKPEAPFDL	101	RKLQPAAMYEIKVRS
66	HSLTCAFEDPDVNTT	84	TITVKPEAPFDLSVIY	102	PAAMYEIKVRSIPDH
67	CAFEDPDVNTTNL	85	PEAPFDLSVIYREG	103	YEIKVRSIPDHYFK

	EF		A		G
68	DPDVNTTNLEFEIC G	86	FDLSVIYREGANDF V	104	VRSIPDHYFKGFWS E
69	NTTNLEFEICGALV E	87	VIYREGANDFVVTF N	105	PDHYFKGFWSSEWS PS
70	LEFEICGALVEVKC L	88	EGANDFVVTFNTS HL	106	FKGFWSSEWSPSY FR
71	ICGALVEVKCLNFR K	89	DFVVTFTNTSHLQKK Y	107	WSEWSPSYFRTPT EI
72	LVEVKCLNFRKLQ EI	90	TFNTSHLQKKYVKV L	108	SPSYFRTPEINNS S
73	KCLNFRKLQEIFY E	91	SHLQKKYVKVLMH DV	109	YFRTPEINNSSGEM D
74	FRKLQEIFYIETKKF	92	KKYVKVLMHDVAY RQ		
75	QEIFYIETKKFLLIG	93	KVLMHDVAYRQEK DE		

[00199] Se incubó un total de 9 muestras sobre portaobjetos de *microarray* usando un formato Multipocillo. Para el anticuerpo N13B2 y las otras muestras, se aplicaron 4 concentraciones diferentes (10, 1, 0,1 y 0,01 µg/ml). Un control negativo de incubación (solamente anticuerpo secundario) se llevó a cabo en paralelo. Proteínas IgG humana y de ratón fueron co-inmovilizadas a lo largo de cada conjunto de péptidos para servir de control del ensayo. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en paralelo utilizando dos portaobjetos. Dos *miniarrays* de péptidos en cada portaobjetos se usaron como control de incubación aplicando el anticuerpo de detección marcado con fluorescencia sola para controlar la unión falso-positivo de los péptidos. Luego de lavar y secar los portaobjetos los mismos fueron relevados con un escáner laser de alta resolución a 635 nm para obtener imágenes de intensidades de fluorescencia. Las imágenes fueron cuantificadas para producir un valor de píxel medio para cada péptido. Anticuerpo secundario anti-IgG de rata (JIR 212-175-082) marcado con Cy5 a 1 µg/ml. Buffers y soluciones: los buffers usados fueron buffer TBS incluyendo Tween 20 0,05% (JPT) y buffer de ensayo T20 (Pierce, SuperBlock TBS T20, #37536). La adquisición y el análisis se llevaron a cabo usando *microarrays* de péptidos (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Alemania; lote #2668), cámara de incubación multipocillo, escaner Axon Genepix 4200AL, software de reconocimiento de puntos GenePix y Microsoft Excel, R.

Ejemplo 18. Mapeo de epítopes mediante análisis por espectrometría de masa

[00200] Se usó espectrometría de masa para identificar un epítipo conformacional. El secuenciamento de epítipo se hizo usando un espectrómetro de masa MALDI. Este instrumento permite una secuencia peptídica de entre 800 y 4000 Da. La digestión de la proteína de interés permite cortar la proteína en pequeños fragmentos (epítipos potenciales). Idealmente, la enzima digestiva debe cortar tan cerca como sea posible de los bordes del epítipo. La elección de la enzima de digestión debe realizarse de acuerdo con la frecuencia del corte de la enzima en la secuencia de la proteína recombinante. Se considera que una segunda digestión reduce el tamaño de los epítipos obtenidos al final de la primera digestión. Dependiendo de la enzima seleccionada, los perfiles difieren significativamente. La enzima que tiene la mejor distribución de digestos sobre la secuencia es la quimiotripsina. Una segunda enzima con una frecuencia de corte adecuada y bien distribuida sobre la secuencia de interés es la Glu C.

[00201] Debido a que el epítipo es conformacional, se da preferencia a la digestión del complejo durante la cromatografía de afinidad. La identificación de la secuencia de interés se basa en la protección del epítipo contra la digestión enzimática mediante la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Luego del paso a través de la cromatografía de afinidad y la digestión, los fragmentos del epítipo se eluyen y secuencian por espectrometría de masa (MALDI-TOF-TOF Bruker). La estructura 3D de la proteína de interés está disponible y se la compara con los resultados obtenidos.

[00202] Uniprot P16871 [21-239] (Seq ID No:114): corresponde al dominio Topológico de la subunidad alfa del receptor de Interleuquina 7 de *Homo sapiens*:

ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNTTNLEFEICGALVEVKCL
NFRKLQEIFYIETKKFLLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTIVKPEAPFDLSVIYREGANDFVVTFN
TSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTHVNLSSSTKLTLQKRLQPAAMYKIVRSIPDHYFK
GFWSEWSPSYFRTPEINNSSGEMD

[00203] Elecciones de enzimas de digestión para CD127 *in silico* (ver aminoácidos subrayados arriba en la secuencia que corresponde a Seq ID No:114): se eligió quimiotripsina como enzima de digestión. Los sitios de corte (líneas gruesas), el número de péptidos y la frecuencia de los cortes son adecuados. Se eligió Glu-C como segunda enzima de digestión. El número de péptidos obtenidos con un peso comprendido entre 800 y 4000 Da es adecuado. La frecuencia de los cortes de Glu-C y la ubicación de los sitios de corte (línea delgada) son adecuados. El procedimiento usado es convencional y bien conocido para la persona experta en el arte y está descrito en Suckau et al, 1990 y Papac et al, 1994.

[00204] Materiales y reactivos: espectrómetro de masa MALDI-TOF/TOF II de Bruker; columnas Hi-trap NHS (Ref: 17-0716-01 –GE Healthcare); quimiotripsina (Ref:11418467001 –

Roche); Glu C (Ref:11420399001 –Roche); Zip/TIP C18 (Ref:ZTC18S096-Millipore); bicarbonato de amonio (Ref: 09830 –Sigma); Glicina (Ref:G7126 –Sigma); NaCl (Ref : 27800.360 –VWR).

[00205] Fase 1 : Digestión de la proteína libre y anticuerpo en solución. Digestión en solución del antígeno libre y del anticuerpo mediante quimiotripsina o Glu-C durante 1h, 2h, 3h, 4h, 5h y durante la noche a temperatura ambiente o 37°C. El análisis de los péptidos digeridos se llevó a cabo por espectrometría de masa (MS) de los péptidos digeridos. Estos experimentos permiten establecer las condiciones adecuadas de digestiones enzimáticas (tiempo y temperatura). El objetivo es tener una digestión suficiente del antígeno, mientras que se impacta la estructura del anticuerpo lo menos posible. Se determinó que las condiciones óptimas son: digestión con quimiotripsina: 1 hora a temperatura ambiente; digestión con Glu-C: durante la noche a 37°C. Cada digesto del antígeno y el anticuerpo se analiza mediante espectrometría de masa MALDI-TOF / TOF.

[00206] Fase 2 : digestión total del complejo completo ligado Ac + antígeno entero. El acoplamiento del anticuerpo monoclonal N13B2-G1 anti-CD127 (lote 210415) se llevó a cabo en una columna Hi-Trap NHS siguiendo el procedimiento estándar. La inmunocaptura del antígeno en la columna se llevó a cabo durante 1 h, permitiendo la formación del complejo antígeno-anticuerpo. La eficiencia de acoplamiento del anticuerpo N13B2-G1 en las cuatro columnas de Hi-Trap NHS fue como sigue: 84%, 84%, 83% y 83%. Se obtuvieron rendimientos de acoplamiento consistentes e idénticos.

[00207] La digestión de los complejos se llevó a cabo en la proporción 1/50, o 1 mg de enzima por 50 mg de anticuerpo, a una temperatura y por la duración determinada por los controles mencionados anteriormente. La columna fue luego lavada con el buffer de lavado (bicarbonato de amonio 25 mM) para remover y recuperar los péptidos de antígeno no unidos. También se lleva a cabo una etapa de lavado en solución fisiológica tamponada (PBS-NaCl 2M) para remover péptidos no específicos. Luego del lavado, se lleva a cabo la elución con un solvente de elución (Glicina 50 mM pH 2) para extraer específicamente y recuperar los péptidos específicamente unidos (los cuales se predice que corresponden al epítipo).

[00208] Análisis MALDI: las fracciones de lavado y eluido son concentradas por cromatografía hidrófoba en una matriz C18. Luego se las analiza por espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF. El análisis de MS puede medir con precisión la masa de los péptidos y la comparación de las masas experimentales con las masas teóricas de los péptidos derivados de la digestión *in silico* de los antígenos libres permite la identificación de los péptidos; puede llevarse a cabo un análisis MS/MS para confirmar la secuencia de un péptido de ser necesario.

[00209] El espectro del eluato luego de la digestión con quimiotripsina revela la presencia de péptidos con una masa de: 912,49; 1086,47; 1843,03; 2104,16; 1944,97; 1564,73; 1835,97; 2022,05; 2424,22 y 2858,42 Da, lo que puede corresponder a los péptidos del antígeno en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10. *Péptidos obtenidos luego de la digestión con quimiotripsina (secuencias protegidas de la proteólisis)*

Masa (Da)	Secuencia	SEQ ID No:
912,49	FIETKKF	115
1843,03	RKLQEIFYETKKF	118
2104,16	NFRKLQEIFYETKKF	119
1944,97	DLSVIYREGANDFVTF	120
1564,73	VVTFNTSHLQKKY	121
1835,97	EIKVRSIPDHYFKGF	122
2022,05	EIKVRSIPDHYFKGFW	123
2424,22	EIKVRSIPDHYFKGFWSEW	124
2858,42	EIKVRSIPDHYFKGFWSEWSPSY	125
1086,47	FKGFWSEW	126

[00210] El espectro del eluato luego de la digestión con Glu-C revela la presencia de péptidos de digestión de nuestra proteína de interés con una masa de 1200,43; 1309,68; 2108,97; 2191,04; 2699,43; 3170,68 y 3264,70 Da que pueden corresponder a los péptidos del antígeno en la **Error! Reference source not found.** a continuación.

Tabla 11. *Péptidos obtenidos luego de la digestión con Glu-C (secuencias protegidas de la proteólisis)*

Masa (Da)	Secuencia	SEQ ID No:
2699,43	IYFIETKKFLLIGKSNICVKVGE	127
3264,70	KSLTCKKIDLTIVKPEAPFDLSVIYRE	128
2191,04	LTTIVKPEAPFDLSVIYRE	129
1309,68	APFDLSVIYRE	130
3170,68	NKWTHVNLSTKLTLQKRLQPAAMYE	131
2108,97	IKVRSIPDHYFKGFWSE	132

[00211] Las dos digestiones nos permitieron identificar tres sitios (Tabla 12 a continuación) involucrados en la interacción entre hN13B2 y el antígeno CD127. Los péptidos derivados de los lavados con el buffer salino fueron excluidos para restringir las secuencias de interés.

Tabla 12. *Secuencias de los péptidos de CD127 humano protegidos por N13B2 contra la proteólisis*

A (SEQ ID No:115)	FIETKKF
B (SEQ ID No:116)	DLSVIY
C (SEQ ID No:117)	FKGF

[00212] El mapeo de epítopes del anticuerpo N13B2 sobre el antígeno CD127 mostró 3 secuencias diferentes importantes para la actividad del anticuerpo en la ruta IL-7/CD127 (Figura 27). Con el análisis de cristalografía 3D de la interacción IL-7/CD127 (McElroy et al, Structure 2009, PDB:3DI2), dos de las secuencias (SEQ ID N°115 y ID N° 117) están estructuralmente cerradas y están ubicadas en la región implicada en la unión de la IL-7 con CD127. La tercera secuencia identificada (SEQ ID N°116) está localizada en el sitio 2b del dominio D2 del receptor, dominio que se ha predicho interactúa con CD132, la cadena gamma del receptor (Walsh et al, 2012). N13B2 reconoce un epítipo conformacional sobre CD127 localizado en 2 partes de la proteína que inhibe la interacción IL-7-CD127 y la formación del heterodímero CD127-CD132. La unión del N13B2 debe desestabilizar la formación del "complejo IL-7Ra/IL-7/cadena g ternario" como lo predijo Walsh ST, lo que bloquea la internalización del complejo.

Ejemplo 19. Resultados

[00213] Como se describió previamente (Henriques et al., 2010), la IL-7 sola induce la rápida internalización (30-40%) de la cadena alfa del receptor de IL-7 (CD127) en la superficie de linfocitos T, lo cual es requerido para la señalización mediada por IL-7. En la presente describimos que el mAb N13B2 previene la internalización de CD127 inducida por IL-7 y o induce esta internalización por sí mismo (Figura 16). En contraste, describimos que el clon 1A11 anti-CD127 humano de GSK (solicitud de patente WO 2011/094259) disminuye drásticamente la expresión de CD127 en la superficie de linfocitos T cuando se aplica solo o en combinación con IL-7 a 37°C (Figura 16). Este efecto fue observado utilizando diferente tinción

con varios anticuerpos anti-IL-7R comerciales (eBioRDR5 y MB15-18C9, datos no mostrados). Después de administración intravenosa del mAb N13B2 quimérico (formateado con un dominio de IgG1 o IgG4 humanas) a 10 mg/Kg en primates no humanos, no medimos reducción de la expresión de CD127 en la superficie de linfocitos T durante un período de 2 semanas de seguimiento (Figura 17B). En contraste, en otros primates no humanos tratados en paralelo intravenosamente con 10 mg/kg de clon MD707-13 anti-CD127 humano (formateado con dominio Fc de IgG4 humana; WO 2013/056984), observamos una disminución significativa (60%) de CD127 en la superficie de linfocitos T (Figura 17B). Esta internalización de CD127 después de la unión del mAb anti-CD127 humano en linfocitos T, también fue previamente publicada por el grupo Pfizer, en donde describen que su mAb anti-CD127 humano (clon HAL-H3L4, Patente US 8.637.273) induce significativamente la internalización de CD127 *ex vivo* en células humanas y de primate no humano, así como *in vivo* luego de administración intravenosa en primates no humanos (Kern et al., 2013).

[00214] En una publicación reciente de Kern et al. (Kern et al., 2015), la ocupación de CD127 fue estudiada y se llevaron a cabo ensayos de competición. El clon HIL-7R-M21 anti-CD127 de BD Biosciences mostró completarse con el anticuerpo HAL/Ab1 (del grupo Pfizer) para la unión a CD127. Como se muestra en la Figura 16 de la presente invención, el anticuerpo HAL (clon H3L4, patente US 8637273) fue comparado con N13B2 y 1A11 en términos de expresión e internalización de CD127. Estos resultados mostraron una competición entre el anticuerpo HAL y la patente HIL-7R-M21, confirmando los datos de Ken et al., 2015. Sin embargo, N13B2 no compete con HIL-7R-M21. Kern et al., también mostraron que HAL/Ab1 en sí mismo induce una regulación negativa *in vivo* de la expresión de CD127 en la superficie celular 4 a 10 días después de inyección del anticuerpo. Aquellos resultados son comparables con los resultados presentados en la Figura 17B de la presente invención con el clon MD707-13. La Figura 17B muestra una regulación negativa de la expresión de CD127 en la superficie celular 4 a 10 días después de la inyección del anticuerpo. Este efecto *in vivo* puede ser correlacionado con la internalización dentro de la célula de CD127 dependiente de MD707-13 *in vitro* observada asimismo.

[00215] El estudio del epítipo mediante *microarray* de péptidos y espectrometría de masa identificó un epítipo conformacional reconocido por N13B2 en CD127. Este epítipo está situado en los dominios D1 y D2, en contraste con los anticuerpos del arte previo que reconocen un epítipo situado sólo en D1 (Ejemplo 17). Además, la Figura 16 muestra que anticuerpos del arte previo inducen internalización de CD127, mientras que N13B2 no. En consecuencia concluimos que la propiedad del N13B2 de no inducir la internalización de CD127 está correlacionada con su propiedad de reconocer un epítipo situado en ambos dominios D1 y D2.

[00216] En conjunto, estos resultados e informes previos mostraron que mAbs anti-CD127 humano (clon 1A11, clones HAL/Ab1 y H3L4 y clon MD707-13) descriptos por bloquear la unión de IL-7 en el receptor de IL-7, también inducen la internalización de la cadena alfa del receptor de IL-7 la cual está asociada y requerida para la señalización del receptor de IL-7. En contraste y de una manera sorprendente, el mAb N13B2 tiene la singular propiedad de no inducir la internalización de CD127 y evita dicha internalización inducida por IL-7. Estos resultados deben ser correlacionados con la observación de que el mAb inductor de la internalización de CD127 (por ejemplo clon MD707-13), que es efectivo *in vitro* para prevenir la señalización del receptor de IL-7 (por ejemplo fosforilación de STAT5, Figura 14B), no es capaz *in vivo* de evitar respuestas inmunes celular (Figura 21) o humoral (Figura 22) de memoria. En contraste, describimos que el mAb N13B2, el cual efectivamente bloquea la señalización del receptor de IL-7 (fosforilación de STAT5) pero no induce la internalización de CD127 *ex vivo* en linfocitos T humanos e *in vivo* en primates no humanos, previene respuestas celulares de memoria de hipersensibilidad de tipo demorado (Figura 21) así como la inmunización contra glóbulos rojos de oveja xenogénicos (Figura 22). Aunque no se observó diferencia entre el isotipo de N13B2 en el control de respuesta humoral de memoria, notamos que N13B2 IgG4-formateado fue más efectivo para prevenir respuestas celulares de memoria comparado con IgG1. No se observaron diferencias en términos de exposición y concentraciones en suero de mAb entre animales tratados con MD707-13 y N13B2. De manera similar, observamos también un incremento significativo de linfocitos T regulatorios en animales tratados tanto con mAb N13B2 como con mAb MD707-13 (Figura 22).

[00217] La IL-7 humana indujo fuerte expresión de las integrinas $\alpha 4$ y $\beta 7$ *in vitro* en linfocitos T humanos y aumentó drásticamente la frecuencia de linfocitos T humanos que expresan integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ (Figura 19A), las cuales son requeridas para alojamiento y retención de linfocitos T en tejidos no linfoides tales como intestino, cerebro y piel (Gorfu et al., 2009, DeNucci et al., 2009). Por consiguiente, se observó que el mAb N13B2 inhibe de manera dependiente de la dosis la expresión *in vitro* tanto de $\alpha 4$ como de $\beta 7$ así como disminuye la frecuencia de linfocitos T humanos $\alpha 4$ -positivos y $\alpha 4/\beta 7$ -positivos (Figura 19B). De manera similar, después de ser transferido de células mononucleares de sangre periférica humana dentro de ratones inmunodeficientes, se observó que el anticuerpo N13B2 disminuye significativa y rápidamente el porcentaje de linfocitos T $\beta 7$ -positivos así como el número (i.d. injerto) de estas células después de una (datos no mostrados) y dos semanas de tratamiento (Figura 20). Los resultados obtenidos en dos modelos diferentes de inflamación muestran que el anticuerpo N13B2 anti-IL-7R α podría ser un tratamiento eficiente contra enfermedades inflamatorias y en particular colitis.

Ejemplo 20. Generación de un epítipo conformacional

[00218] Pueden utilizarse péptidos CLIPS para imitar adecuadamente la estructura secundaria y terciaria del antígeno con el objeto de traducir estos péptidos CLIPS en inmunógenos activos y potentes que inducen los anticuerpos deseados (Boshuizen et al, 2014). La tecnología CLIPS involucra el uso de (múltiple) ciclización de péptidos lineales mediante reacción con una entidad rígida pequeña (andamiaje químico) que lleva 2, 3 o 4 puntos de anclaje. Los anclajes reaccionan exclusivamente con un tipo de funcionalidades del péptido (es decir tioles) y se unen al péptido mediante múltiples enlaces covalentes. El péptido se pliega alrededor del andamiaje y pierde flexibilidad mientras adopta lentamente una estructura tridimensional bien definida, con la entidad andamiaje en el centro como una “araña en la tela”.

[00219] La tecnología hace uso de andamiajes a medida, completamente sintéticos. Los andamiajes CLIPS varían principalmente en tamaño, polaridad, rigidez, solubilidad, funcionalidad, y distancia “espaciado de SS”. Estos andamiajes son utilizados para fijar los extremos sueltos del péptido. Cuando están posicionados apropiadamente dentro de la secuencia peptídica, es probable que el péptido CLIPS resultante se parezca mucho mejor a la estructura 3D de la correspondiente región en la proteína intacta comparado con la secuencia lineal. Las ciclizaciones de CLIPS pueden ser llevadas a cabo sobre residuos L-cisteína nativos, pero también sobre D- y L-(homo)cisteínas introducidas artificialmente en virtualmente cualquier posición deseada en la secuencia. En consecuencia, la estructura y dimensiones de los péptidos CLIPSados pueden variar a voluntad. La reacción de ciclización no dura más de 30 min, corre a temperatura ambiente y no requiere ninguna clase de catalizador. Más aún, puede ser aplicada bajo condiciones completamente acuosas y pH neutro (7,5-8,0) y en consecuencia es compatible con sistemas biológicos sensibles, como fagos bacterianos. Finalmente, la reacción puede ser corrida en condiciones de alta dilución (10-100 μ M) lo que promueve altos rendimientos de productos cíclicos y evita la polimerización. Esta tecnología es altamente versátil, y singular por su facilidad de aplicación.

[00220] En un intento de reconstruir tanto los epítopes lineales como discontinuos para el anticuerpo anti-receptor, se sintetizaron péptidos superpuestos multímeros lineales directamente sobre placas de polipropileno del tamaño de una tarjeta de crédito con el extremo C-terminal acoplado al fondo de cada pocillo de 3 μ l (455 pocillos por placa), y cada pocillo conteniendo un péptido diferente. Dentro de cada uno de los péptidos de dominio único, se formó un puente de dicisteína ciclizadas para insertar un bucle constreñido en los péptidos unidos a la placa. Teeling et al, 2006, explican cómo generar péptidos ciclizados con péptidos de interés con el objetivo de reconstituir epítopes discontinuos reconocidos por el anticuerpo de interés. Brevemente, primero se sintetizan péptidos que contienen dicisteína unida a la placa con cisteínas espaciadas entre 4 y 13 aminoácidos a lo largo del péptido, por ejemplo CXXXXC-placa, XXXCXXXXCXXXXXX-placa, o CXXXXC-placa, etc. Los péptidos son luego

ciclizados mediante tratamiento con a,a-dibromoxileno en solución acuosa para proveer bucles de cisteína conteniendo diferentes números de aminoácidos. Esta modificación química provee bucles más estables que la de los puentes disulfuro. (Niederfellner et al, 2011)

Ejemplo 21. Co-inmunoprecipitación de CD127 y γ c

[00221] Para ensayar el efecto de N13B2 y de anticuerpos del arte previo sobre la unión de CD127 a la cadena γ c, se llevó a cabo un experimento de co-inmunoprecipitación en células estimuladas por IL-7 e incubadas en ausencia de anticuerpos o en presencia de anticuerpos MD707-13 o N13B2. En ausencia de anticuerpos, CD127 y γ c demostraron co-inmunoprecipitar. La incubación de células con MD707-13 no previno esta co-inmunoprecipitación, mientras que la incubación con N13B2 condujo a la ausencia de dicha co-inmunoprecipitación. Nuestro anticuerpo en consecuencia es capaz de interrumpir la unión de CD127 a la cadena γ c, mientras que los anticuerpos del arte previo no tienen tal característica.

[00222] Para co-inmunoprecipitar el complejo CD127-CD132-IL-7 en presencia de anti-CD127, se incubaron PBL humanas con anticuerpo anti-hCD127 de rata (N13B2 de rata o MD707-13 a 10 μ g/ml) durante 30 min a 37°C, antes de estimulación con IL-7 (AbD Serotec, ref PHP046) a 5 ng/ml durante 15 min a 37°C. La reacción fue detenida a 4°C, y lavada dos veces con PBS frío antes de agregar buffer de lisis del kit de co-inmunoprecipitación (Pierce Direct IP kit, ref 26148).

[00223] Se preparó una columna de purificación de anti-CD127 humano con el kit de co-inmunoprecipitación (Pierce Direct IP kit, ref 26148). La columna fue acoplada con 75 μ g de un anti-CD127 humano de rata no competitivo (Effimune, MD707-9), siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. El lisado fue prepurificado sobre una columna no acoplada con el objeto de eliminar ligante no específico. Luego, se agregó lisado a la columna anti-CD127 y se incubó 2h a 4°C, en agitación rotativa. La columna fue lavada dos veces con buffer de lavado, y luego fue eluida con buffer de elución. Las muestras recuperadas fueron analizadas mediante Western Blot.

[00224] Para Western Blot, se preparó gel SDS-Page (10% para resolución, 4% para gel apilado, con espesor de 1,5 mm) y se agregaron en cada pocillo 50 μ l de eluato desnaturalizado (para desnaturalización: DTT 0,1M y 10 min a 95°C). Se agregó proteína recombinante CD127Fc (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H08H) y CD132Fc (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10555-H02H) (5 μ g/pocillo) como control para detección por Western Blot. Después de migración durante 1h30 a 200V, y transferencia sobre membrana de nitrocelulosa durante 35 min a 20V, se llevó a cabo saturación durante 2h a temperatura ambiente en leche 5%.

[00225] Para comenzar la detección se agregó anticuerpo anti-CD132 humano de conejo (anticorps-en-ligne, France, referencia ABIN741840) a 1/50 durante la noche a 4°C, luego revelado con anticonejo de cabra marcado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch, referencia 111-035-144) a 1/2000 durante 1h a temperatura ambiente. Después de deshibridización, la membrana fue incubada con anticuerpo anti-CD127 humano de rata (Effimune, MD707-9) a 1/200 durante la noche a 4°C, y revelada con anticuerpo antirrata de asno marcado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch, referencia 712-035-153) a 1/1000 durante 1h a temperatura ambiente. Para cada revelado, se utilizó ECL (Thermo Scientific, referencia 34080) para detectar peroxidasa por quimioluminiscencia y los resultados fueron leídos en una cámara Fuji 4000.

[00226] La Figura 28 muestra los resultados de la co-inmunoprecipitación del complejo CD127/IL-7/CD132. Se observó que la cadena CD132 (60 KDa) co-inmunoprecipita con CD127 en cualquier condición excepto cuando las células son incubadas con el anticuerpo N13B2 (28A). Sin embargo, en cada condición CD127 (70 KDa) es bien inmunoprecipitado por el anticuerpo MD707-9 como se muestra en la Figura 28B indicando que N13B2 y MD707-13 no compiten con MD707-9 por el reconocimiento de CD127. El anticuerpo N13B2 inhibe la formación del complejo CD127/CD132 en presencia de IL-7. Estos resultados son consistentes con el mapeo de epítopes del anticuerpo N13B2 en CD127, mostrando que N13B2 se une a una secuencia de aminoácidos dentro del sitio 2b en el dominio D2 de la cadena alfa de IL-7R (Walsh et al, Immunol rev. 2012).

[00227] En conjunto estos resultados mostraron que el anticuerpo N13B2 es un antagonista de la interacción IL-7/CD127 así como un antagonista de la interacción CD127/CD132 en el sitio 2b en presencia de IL-7, lo que podría explicar la actividad inhibitoria del anticuerpo contra la internalización de CD127 observada con IL-7 y/o anticuerpos anti-CD127 del arte previo.

Las siguientes formas de realización numeradas constituyen formas de realización preferidas de la invención.

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o un mimético de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente a CD127 y no induce la internalización de CD127.
2. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, en particular de acuerdo con la forma de realización 1, el cual inhibe la internalización de CD127 inducida por IL-7.
3. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con la forma de realización 1 o 2 en donde la expresión en superficie celular de CD127 en

células tratadas con IL-7 en presencia del anticuerpo o fragmento es al menos 80%, preferiblemente al menos 90% de su nivel en células incubadas en ausencia del anticuerpo.

4. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CD127 y de este modo interrumpe la unión de CD127 a la cadena común γ c de receptores de citoquinas.
5. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 3, que interrumpe la unión de CD127 a la cadena común γ c de receptores de citoquinas cuanto se une a CD127.
6. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 4 o 5, en presencia del cual la cantidad de γ c unida a CD127 es menor que 80%, preferiblemente menor que 50%, aún más preferiblemente menor que 25% o 10% de dicha cantidad medida en ausencia de anticuerpos en condiciones de otro modo idénticas, en particular cuando dicha medición es llevada a cabo en lisados celulares que comprenden complejos moleculares que contienen CD127 a partir de células intactas que expresan el receptor de IL-7 en la superficie celular, incubadas en presencia o ausencia de dichos anticuerpos.
7. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, el cual es un antagonista de la señalización de IL-7R inducida por IL-7.
8. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, en particular de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, el cual específicamente se une y/o ha sido generado contra un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 a 67 o el epítipo de dicho antígeno.
9. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, que se une específicamente a CD127, en particular de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, que no incrementa la maduración de células dendríticas inducida por TSLP.
10. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores el cual inhibe la expresión de las integrinas α 4, β 7 y/o α 4/ β 7.
11. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con la forma de realización 10 el cual inhibe la expresión de las integrinas α 4, β 7 y/o α 4/ β 7 *in vivo*, en particular en células T humanas inyectadas en un ratón inmunodeficiente.

12. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, que se une específicamente a CD127, en particular de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende una cadena VH que comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- VHCDR1 SEQ ID No:10;
- VHCDR2 SEQ ID No:12;
- VHCDR3 SEQ ID No:14 o SEQ ID No:48; o
- VH SEQ ID No:22

y/o una cadena VL que comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- VLCDR1 SEQ ID No:16 o SEQ ID No:50;
- VLCDR2 SEQ ID No:18 o SEQ ID No:52;
- VLCDR3 SEQ ID No:20; o
- VL SEQ ID No:24.

13. Un anticuerpo o un fragmento o mimético del mismo de acuerdo con la forma de realización 12 el cual comprende al menos dos, tres, cuatro o cinco secuencias de CDR seleccionadas del grupo que consiste en VHCDR1 SEQ ID No:10, VHCDR2 SEQ ID No:12, VHCDR3 SEQ ID No:14 o SEQ ID No:48, VLCDR1 SEQ ID No:16 o SEQ ID No:50, VLCDR2 SEQ ID No:18 o SEQ ID No:52 y VLCDR3 SEQ ID No:20.

14. Un anticuerpo o un fragmento o mimético del mismo de acuerdo con la forma de realización 13 que comprende las seis secuencias de CDR VHCDR1 SEQ ID No:10, VHCDR2 SEQ ID No:12, VHCDR3 SEQ ID No:14 o SEQ ID No:48, VLCDR1 SEQ ID No:16 o SEQ ID No:50, VLCDR2 SEQ ID No:18 o SEQ ID No:52 y VLCDR3 SEQ ID No:20.

15. Un anticuerpo de acuerdo con la forma de realización 14 en donde

- la cadena VH consiste en la cadena VH con la secuencia de SEQ ID No:2 o de SEQ ID No:6 o de SEQ ID No:54 o comprende la secuencia de SEQ ID No:22 o de SEQ ID No:36 o de SEQ ID No:38 o de SEQ ID No:40; y
- la cadena VL consiste en la cadena VL con la secuencia de SEQ ID No:4 o de SEQ ID No:56 o comprende la secuencia de SEQ ID No:24 o de SEQ ID No:42 o de SEQ ID No:44 o de SEQ ID No:46.

16. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores el cual es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado o un anticuerpo desinmunizado.

17. Un anticuerpo de acuerdo con la forma de realización 13 el cual es un anticuerpo

humanizado y desinmunizado, en donde la cadena pesada tiene la secuencia de SEQ ID No:52 y la cadena liviana tiene la secuencia de SEQ ID No:54.

18. Una macromolécula la cual es una molécula quimérica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde dicho anticuerpo está asociado con una molécula funcionalmente diferente siendo dicha molécula quimérica ya sea una proteína quimérica de fusión o un conjugado resultante de unión covalente de un grupo químico o molécula, tal como un polímero PEG o un anticuerpo marcado.
19. Una macromolécula de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores, la cual es una afitina o una anticalina.
20. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores que se une a CD127 con una Kd menor que 5×10^{-10} M, especialmente menor que 1×10^{-10} M, especialmente menor que 5×10^{-11} M.
21. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores que exhibe actividad citotóxica hacia células CD127-positivas.
22. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización anteriores que no incrementa la maduración de células dendríticas inducida por TSLP, en donde el incremento en la maduración de células dendríticas inducido por TSLP es evaluado determinando una expresión elevada del marcador de superficie celular CD40 y/o CD80 en células positivas para el receptor TSLP tratadas con TSLP y con dicha macromolécula comparada con células tratadas con TSLP solo.
23. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, de acuerdo con la forma de realización 22 en donde la expresión de CD80 está elevada en no más de 25%, preferiblemente no más de 10%, en células positivas para receptor TSLP tratadas con TSLP y con dicha macromolécula, comparada con células tratadas con TSLP solo.
24. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, de acuerdo con la forma de realización 23 en donde la expresión de CD80 no está elevada o está disminuida en células positivas para el receptor TSLP tratadas con TSLP y con dicha macromolécula, comparada con células tratadas con TSLP solo.
25. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o

mimético del mismo de acuerdo con la forma de realización 22 en donde la expresión de CD40 está elevada en no más de 50%, preferiblemente no más de 25%, en células positivas para el receptor TSLP tratadas con TSLP y con dicha macromolécula comparada con células tratadas con TSLP solo.

26. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, de acuerdo con la forma de realización 25 en donde la expresión de CD40 no está elevada o está disminuida en células positivas para el receptor TSLP tratadas con TSLP y con dicha macromolécula, comparada con células tratadas con TSLP solo.
27. Una molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o macromolécula de cualquiera de las formas de realización anteriores.
28. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 27 que codifica para una secuencia de aminoácidos elegida del grupo que consiste en SEQ ID No:2; SEQ ID No:4; SEQ ID No:6; SEQ ID No:8; SEQ ID No:10; SEQ ID No:12; SEQ ID No:14; SEQ ID No:16; SEQ ID No:18; SEQ ID No:20; SEQ ID No:22; SEQ ID No:24; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54 y SEQ ID No:56.
29. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la forma de realización 28 la cual es elegida del grupo que consiste en SEQ ID No:1; SEQ ID No:3; SEQ ID No:5; SEQ ID No:7; SEQ ID No:9; SEQ ID No:11; SEQ ID No:13; SEQ ID No:15; SEQ ID No:17; SEQ ID No:19; SEQ ID No:21; SEQ ID No:23; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQ ID No:43; SEQ ID No:45; SEQ ID No:47; SEQ ID No:49; SEQ ID No:51; SEQ ID No:53 y SEQ ID No:55.
30. Un vector para la clonación y/o para la expresión de un polinucleótido de cualquiera de las formas de realización 27 a 29, especialmente un plásmido, adecuado para clonación y/o expresión en células de mamífero.
31. Una célula o línea celular recombinada con un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 27 a 30, especialmente una célula o línea celular de mamífero.
32. Una composición farmacéutica que comprende una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 26, con un vehículo farmacéutico, en donde dicha composición farmacéutica comprende opcionalmente un ingrediente activo adicional diferente..

33. Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente terapéuticamente activo una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 26 o una composición farmacéutica de la forma de realización 32 en una formulación adecuada para controlar la diferenciación/maduración de células dendríticas cuando se administra a un paciente humano.
34. Una composición farmacéutica de las formas de realización 32 o 33, que comprende además un compuesto adicional que tiene un efecto inmunomodulador terapéutico en particular sobre las células implicadas en una enfermedad autoinmune o en una enfermedad alérgica, leucemia tal como leucemia linfoblástica aguda, linfoma, una enfermedad de cáncer, una infección viral crónica, enfermedades inflamatorias, trasplante, enfermedades respiratorias o autoinmunidad.
35. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 26 o un ácido nucleico de cualquiera de las formas de realización 27 a 30 o una célula o línea celular de la forma de realización 31 para uso como un ingrediente terapéuticamente activo en una combinación o en un régimen terapéutico aditivo (*add-on*) en un paciente en necesidad del mismo.
36. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 26 o un ácido nucleico de cualquiera de las formas de realización 27 a 30 o una célula o línea celular de la forma de realización 31 o una composición farmacéutica de cualquiera de las formas de realización 32 a 34 para uso en el tratamiento de un paciente, en particular un paciente humano, con una enfermedad.
37. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 26 o un ácido nucleico de cualquiera de las formas de realización 27 a 30 o una célula o línea celular de la forma de realización 31 o una composición farmacéutica de cualquiera de las formas de realización 32 a 34 para uso en el tratamiento de un paciente, en particular un paciente humano, en riesgo de una enfermedad.
38. Una macromolécula, ácido nucleico, célula, líneas celulares o composición farmacéutica para uso de acuerdo con la forma de realización 36 y/o forma de realización 37, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmune, en particular artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, tiroiditis autoinmune y lupus.
39. Una macromolécula, ácido nucleico, célula, líneas celulares o composición farmacéutica

para uso de acuerdo con la forma de realización 36 y/o forma de realización 37, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria, en particular IBD y encefalomiелitis.

40. Una macromolécula, ácido nucleico, célula, líneas celulares o composición farmacéutica para uso de acuerdo con la forma de realización 36 y/o forma de realización 37, en donde la enfermedad es una enfermedad alérgica.
41. Una macromolécula, ácido nucleico, célula, líneas celulares o composición farmacéutica para uso de acuerdo con la forma de realización 36 y/o forma de realización 37, en donde la enfermedad es una enfermedad de cáncer.
42. Una macromolécula, ácido nucleico, célula, líneas celulares o composición farmacéutica para uso de acuerdo con la forma de realización 36 y/o forma de realización 37, en donde la enfermedad es una enfermedad respiratoria.
43. Una macromolécula, ácido nucleico, célula, líneas celulares o composición farmacéutica para uso de acuerdo con la forma de realización 36 y/o forma de realización 37, en donde la enfermedad está relacionada con, en particular es una consecuencia de, trasplante.
44. Un método de tratamiento que comprende la administración de una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 26 o un ácido nucleico de cualquiera de las formas de realización 27 a 30 o célula o línea celular de la forma de realización 31 o composición farmacéutica de las formas de realización 32 a 34 en un paciente con, o en riesgo de, una enfermedad.
45. Un método de tratamiento de acuerdo con la forma de realización 44, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmune, en particular artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, tiroiditis autoinmune y lupus.
46. Un método de tratamiento de acuerdo con la forma de realización 44, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria, en particular IBD y encefalomiелitis.
47. Un método de tratamiento de acuerdo con la forma de realización 44, en donde la enfermedad es una enfermedad alérgica.
48. Un método de tratamiento de acuerdo con la forma de realización 44, en donde la enfermedad es una enfermedad de cáncer.
49. Un método de tratamiento de acuerdo con la forma de realización 44, en donde la enfermedad es una enfermedad respiratoria.
50. Un método de tratamiento de acuerdo con la forma de realización 44, en donde la

enfermedad está relacionada con, en particular es una consecuencia de, trasplante.

51. Una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 26 o un ácido nucleico de cualquiera de las formas de realización 27 a 30 o una célula o línea celular de la forma de realización 31 o una composición farmacéutica de cualquiera de las formas de realización 32 a 34 para uso en el tratamiento de un paciente, en particular un paciente humano, en necesidad de trasplante y/o próximo a ser trasplantado y/o en un paciente trasplantado.
52. Un método de tratamiento que comprende la administración de una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o mimético del mismo de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 26 o un ácido nucleico de cualquiera de las formas de realización 27 a 30 o célula o línea celular de la forma de realización 31 o composición farmacéutica de las formas de realización 32 a 34 en un paciente en necesidad de trasplante y/o próximo a ser trasplantado y/o en un paciente trasplantado.
53. Un antígeno en donde el epítipo comprende o consiste en secuencias del sitio 2b de CD127, en particular que comprende al menos 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos consecutivos del sitio 2b de CD127.
54. Un antígeno de acuerdo con la forma de realización 53, en donde el epítipo comprende, o consiste en, secuencias del sitio que consiste en los aminoácidos 109 a 127 de SEQ ID No:114, en particular del sitio que consiste en los aminoácidos 110 a 125, 112 a 125, 112 a 120, en particular que comprende al menos 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos consecutivos de dicho sitio.
55. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 a 54, en donde el epítipo comprende al menos 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos consecutivos de CD127, en donde dichos aminoácidos consecutivos comprenden P112 y/o L115.
56. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 a 55, en donde el epítipo consiste en, o comprende, la secuencia de SEQ ID No:116, en particular comprende la secuencia de SEQ ID No:86.
57. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 a 56, en donde el epítipo también comprende secuencias, en particular al menos 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos consecutivos, del dominio D1 de CD127, en particular de los aminoácidos 1-98 de SEQ ID No:114.
58. Un antígeno de acuerdo con la forma de realización 57, en donde el epítipo comprende la secuencia de CD127 humano que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID

No:115, en particular que comprende o consiste en SEQ ID No:110

59. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 a 58, en donde el epítipo también comprende secuencias, en particular al menos 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos consecutivos, de los aminoácidos 180-220 de SEQ ID No:114, en particular en donde dichas secuencias de los aminoácidos 180-220 de SEQ ID No:114 consiste en, o comprende, la secuencia de SEQ ID No:117, en particular comprende o consiste en SEQ ID No:111.
60. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 a 59, en donde el epítipo consiste en, o comprende, las secuencias de CD127 humano que consisten en:
- la secuencia de SEQ ID No:110 o la secuencia de SEQ ID No:115;
 - la secuencia de SEQ ID No:111 o la secuencia de SEQ ID No:117; y
 - la secuencia de SEQ ID No:86 o la secuencia de SEQ ID No:116.
61. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 a 60, en donde el epítipo no comprende más de 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos 99-108 de SEQ ID No:114 y/o no comprende más de 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos 128-179 de SEQ ID No:114, y/o no comprende más de 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos 220-239 de SEQ ID No:114, en particular no comprende más de 3, 4 o 5 aminoácidos consecutivos de cualquiera de dichas secuencias de aminoácidos de SEQ ID No:114.
62. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 o 60, en donde la secuencia epítipo de CD127 humano que comprende SEQ ID No:110 no se extiende para comprender los aminoácidos adyacentes a dicha secuencia en la secuencia de CD127 humano en más de 1 aminoácido N-terminal o en más de 7 aminoácidos C-terminales.
63. Un antígeno de acuerdo con la forma de realización 61, en donde la secuencia del epítipo de CD127 humano que comprende SEQ ID No:110 no se extiende para comprender cualquiera de los aminoácidos N-terminales y/o C-terminales adyacentes a dicha secuencia en la secuencia de CD127 humano.
64. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 a 63, en donde la secuencia del epítipo de CD127 humano que comprende SEQ ID No:111 no se extiende para comprender los aminoácidos adyacentes a dicha secuencia en la secuencia de CD127 humano en más de 30 aminoácidos N-terminales o en más de 30

aminoácidos
C-terminales.

65. Un antígeno de acuerdo con la forma de realización 64, en donde la secuencia del epítoto de CD127 humano que comprende SEQ ID No:111 no se extiende para comprender cualquiera de los aminoácidos N-terminales y/o C-terminales adyacentes a dicha secuencia en la secuencia de CD127 humano.
66. Un antígeno de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 53 a 65, en donde el epítoto es un epítoto conformacional, en particular en donde los péptidos de CD127 comprendidos en dicho epítoto están en una conformación que imita la conformación de los correspondientes péptidos en el CD127 nativo o dominio extracelular del mismo, en particular en CD127 en su forma monomérica sin ligando, en su forma unida a γ C y/o en su forma unida a IL-7.
67. Un antígeno de acuerdo con la forma de realización 66, en donde el epítoto es un epítoto conformacional, en el cual los péptidos de CD127 están unidos a una estructura central molecular rígida que los mantiene en la conformación deseada, en particular tal como un antígeno obtenido mediante la tecnología CLIPS. .
68. Un epítoto como se define en cualquiera de las formas de realización 53 a 67.
69. Un ácido nucleico que codifica un antígeno como se define en cualquiera de las formas de realización 53 a 67.
70. Un método para fabricar un anticuerpo que comprende inmunizar un animal no humano contra un antígeno como se define en cualquiera de las formas de realización 53 a 67.
71. Un método para seleccionar un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo o un mimético de anticuerpo, en particular un anticuerpo obtenido como en la forma de realización 70 o fragmento o mimético del mismo, que comprende una etapa de ensayo de la capacidad de unión de dicho anticuerpo a al menos un antígeno como se define en cualquiera de las formas de realización 53 a 67, en particular en donde dicho método comprende varias de dichas etapas sucesivas, ensayando cada etapa la capacidad de unión de un péptido distinto que consiste en una única secuencia contigua de CD127.
72. Un método para seleccionar una macromolécula, en particular un anticuerpo, en particular un anticuerpo obtenido como en la forma de realización 70, o un fragmento de unión a antígeno o mimético de dicho anticuerpo, que comprende o consiste en una etapa de ensayo de la capacidad de unión de la macromolécula a CD127, en particular a un antígeno del mismo como se define en cualquiera de las formas de realización 53 a

67 y opcionalmente seleccionar macromoléculas de acuerdo con la forma de realización 20.

73. Un método para seleccionar una macromolécula de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 72, en donde el antígeno comprende varios péptidos de CD127 no contiguos y en donde el método comprende varias etapas, consistiendo cada una de dichas etapas en el ensayo de la capacidad de unión de la macromolécula a uno de dichos péptidos de CD127.
74. Un método, en particular de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 73, para seleccionar una macromolécula, en particular un anticuerpo, en particular un anticuerpo obtenido como en la forma de realización 70, o un fragmento de unión a antígeno o mimético de dicho anticuerpo, que comprende o consiste en la etapa de ensayo de la internalización de CD127 en células que expresan CD127 inducida por la presencia de la macromolécula.
75. Un método, en particular de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 74, para seleccionar una macromolécula, en particular un anticuerpo, en particular un anticuerpo obtenido como en la forma de realización 70, o un fragmento de unión a antígeno o mimético de dicho anticuerpo, que comprende o consiste en la etapa de ensayo de la inhibición por la macromolécula de la internalización de CD127 inducida por IL-7 en células que expresan CD127 y opcionalmente seleccionar macromoléculas de acuerdo con la forma de realización 3.
76. Un método, en particular de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 75, para seleccionar una macromolécula, en particular un anticuerpo, en particular un anticuerpo obtenido como en la forma de realización 70, o un fragmento de unión a antígeno o mimético de dicho anticuerpo, que comprende o consiste en la etapa de ensayo de la capacidad de dicha molécula de interrumpir, mediante su unión a CD127, la unión de CD127 a la cadena γ c.
77. Un método, en particular de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 76, para seleccionar una macromolécula, en particular un anticuerpo, en particular un anticuerpo obtenido como en la forma de realización 70, o un fragmento de unión a antígeno o mimético de dicho anticuerpo, que comprende o consiste en la etapa de ensayo del incremento de la maduración de CDs inducido por TSLP en presencia de la macromolécula y opcionalmente seleccionar macromoléculas de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 22 a 26.
78. Un método de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 71 a 77, que comprende además una o más de las siguientes etapas:

- a. Ensayar la inhibición por la macromolécula de la señalización inducida por IL-7, en particular fosforilación de STAT5;
- b. Ensayar la inhibición por la macromolécula de la producción de TARC inducida por TSLP;
- c. Ensayar la inhibición por la macromolécula de la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o expresión de la integrina $\alpha 4/\beta 7$, en particular la expresión en superficie celular en linfocitos T.

Referencias

- Adams, A.B., Pearson, T.C., y Larsen, C.P. (2003). Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol. Rev.* 196, 147–160.
- Albuquerque, A.S., Cortesão, C.S., Foxall, R.B., Soares, R.S., Victorino, R.M.M., y Sousa, A.E. (2007). Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 3252–3259.
- Baca, M., Presta, L.G., O'Connor, S.J., y Wells, J.A. (1997). Antibody humanization using monovalent phage display. *J. Biol. Chem.* 272, 10678–10684.
- Van Bodegom, D., Zhong, J., Kopp, N., Dutta, C., Kim, M.-S., Bird, L., Weigert, O., Tyner, J., Pandey, A., Yoda, A., et al. (2012). Differences in signaling through the B-cell leukemia oncoprotein CRLF2 in response to TSLP and through mutant JAK2. *Blood* 120, 2853–2863.
- Boshuizen, R.S., Marsden, C., Turkstra, J., Rossant, C.J., Slootstra, J., Copley, C., y Schwamborn, K. (2014). A combination of in vitro techniques for efficient discovery of functional monoclonal antibodies against human CXCR2 chemokine receptor-2 (CXCR2). *mAbs* 6, 1415–1424.
- Bour-Jordan, H., Esensten, J.H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M., y Bluestone, J.A. (2011). Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol. Rev.* 241, 180–205.
- Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.-L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., y Stinissen, P. (2010). Haplotype 4 of the sclerosis múltiple-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun.* 11, 326–333.
- Chassoux, D.M., Linares-Cruz, L.G., Bazin, H., y Stanislawski, M. (1988). K-cell-mediated cytotoxicity induced with rat monoclonal antibodies. I. Antibodies of various isotypes differ in their ability to induce cytotoxicity mediated by rat and human effectors. *Immunology* 65, 623–628.

- Chothia, C., y Lesk, A.M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901–917.
- Deininger, P. (1990). *Molecular cloning: A laboratory manual*: 2° ed. Editada por J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (en 3 volúmenes). *Anal. Biochem.* 186, 182–183.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., y Roitt, I.M. (2011). *Roitt's Essential Immunology* (John Wiley & Sons).
- Denucci, C.C., Mitchell, J.S., y Shimizu, Y. (2009). Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there. *Crit. Rev. Immunol.* 29, 87–109.
- Dustin, M.L., y Shaw, A.S. (1999). Costimulation: building an immunological synapse. *Science* 283, 649–650.
- Edward G. Routledge, S.D.G. (1993). Reshaping antibodies for therapy. 13–44.
- Flavell, D.J., Warnes, S.L., Bryson, C.J., Field, S.A., Noss, A.L., Packham, G., y Flavell, S.U. (2006). The anti-CD20 antibody rituximab augments the immunospecific therapeutic effectiveness of an anti-CD19 immunotoxin directed against human B-cell linfoma. *Br. J. Haematol.* 134, 157–170.
- Gaseitsiwe, S., Valentini, D., MahdaviFar, S., Reilly, M., Ehrnst, A., y Maeurer, M. (2010). Peptide microarray-based identification of Mycobacterium tuberculosis epitope binding to HLA-DRB1*0101, DRB1*1501, and DRB1*0401. *Clin. Vaccine Immunol.* CVI 17, 168–175.
- Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., y Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr. Mol. Med.* 9, 836–850.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., y Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221–227.
- Haas, J., Korpöral, M., Schwarz, A., Balint, B., y Wildemann, B. (2011). The interleukin-7 receptor α chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 41, 845–853.
- Haudebourg, T., Poirier, N., y Vanhove, B. (2009). Depleting T-cell subpopulations in organ trasplant. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 22, 509–518.
- He, R., y Geha, R.S. (2010). Thymic stromal lymphopoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183, 13–24.
- Henriques, C.M., Rino, J., Nibbs, R.J., Graham, G.J., y Barata, J.T. (2010). IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood* 115, 3269–3277.

- Von Horsten, H.H., Ogorek, C., Blanchard, V., Demmler, C., Giese, C., Winkler, K., Kaup, M., Berger, M., Jordan, I., y Sandig, V. (2010). Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-D-lyxo-4-hexulose reductase. *Glycobiology* 20, 1607–1618.
- Inaba, K., Inaba, M., Witmer-Pack, M., Hatchcock, K., Hodes, R., y Steinman, R.M. (1995). Expression of B7 costimulator molecules on mouse dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 378, 65–70.
- Jariwala, S.P., Abrams, E., Benson, A., Fodeman, J., y Zheng, T. (2011). The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 41, 1515–1520.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M. y Gottesman, K.S. (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest (DIANE publishing, 1992).
- Kern, B., Kraynov, E., Lee, L.-F., Ray, R. (2013). Receptor occupancy and internalization of an anti-IL-7 receptor antibody. *Cytokine* 63, 276-277.
- Kern, B., Li, W., Bono, C., Lee, L.-F., y Kraynov, E. (2015). Receptor occupancy and blocking of STAT5 signaling by an anti-IL-7 receptor α antibody in cynomolgus monkeys. *Cytometry B Clin. Cytom.*
- Krehenbrink, M., Chami, M., Guilvout, I., Alzari, P.M., Pécorari F., Pugsley A.P. (2008). Artificial binding proteins (Affitins) as probes for conformational changes in secretin PulD. *J Mol Biol.* 2008 Nov 28.
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Bodmer, J., Müller, W., Bontrop, R., Lemaitre, M., Malik, A., Barbié, V., y Chaume, D. (1999). IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic acids Res.* 27, 209–212.
- Lei, L., Zhang, Y., Yao, W., Kaplan, M.H., y Zhou, B. (2011). Thymic Stromal Lymphopoietin Interferes with Airway Tolerance by Suppressing the Generation of Antigen-Specific Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 186, 2254–2261.
- Luo, H., Wu, Z., Qi, S., Jin, W., Han, B., Wu, J. (2011). Ephrinb1 and Ephrinb2 are associated with interleukin-7 receptor α and retard its internalization from the cell surface. *J Biol Chem.* 2011 Dec 30;286(52):44976-87.
- Martin, A.C.R. (2001). Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In *Antibody Engineering*, D.R. Kontermann, y D.S. Dübel, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 422–439.

- Mazzucchelli, R., Hixon, J.A., Spolski, R., Chen, X., Li, W.Q., Hall, V.L., Willette-Brown, J., Hurwitz, A.A., Leonard, W.J., y Durum, S.K. (2008). Development of regulatory T cells requires IL-7R α stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112, 3283–3292.
- McElroy, C.A., Dohm, J.A., y Walsh, S.T.R. (2009). Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7R α complex. *Struct. Lond. Engl.* 1993 17, 54–65.
- McElroy, C.A., Holland, P.J., Zhao, P., Lim, J.-M., Wells, L., Eisenstein, E., y Walsh, S.T.R. (2012). Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2503–2508
- Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullillou, J.-P., y Laplaud, D.-A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor α -chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* 118, 3411–3419.
- Nancey, S., Hamzaoui, N., Moussata, D., Graber, I., Bienvenu, J., y Flourie, B. (2008). Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and Crohn's disease activity. *Dig. Dis. Sci.* 53, 242–247.
- Niederfellner, G., Lammens, A., Mundigl, O., Georges, G.J., Schaefer, W., Schwaiger, M., Franke, A., Wiechmann, K., Jenewein, S., Slootstra, J.W., et al. (2011). Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies. *Blood* 118, 358–367.
- Olivier, S., Jacoby, M., Brillon, C., Bouletreau, S., Mollet, T., Nerrière, O., Angel, A., Danet, S., Souttou, B., Guehenneux, F., et al. (2010). EB66 cell line, a duck embryonic stem cell-derived substrate for the industrial production of therapeutic monoclonal antibodies with enhanced ADCC activity. *mAbs* 2, 405–415.
- Olkhanud, P.B., Rochman, Y., Bodogai, M., Malchinkhuu, E., Wejksza, K., Xu, M., Gress, R.E., Hesdorffer, C., Leonard, W.J., y Biragyn, A. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is a key mediator of breast cancer progression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 5656–5662.
- Van Oosterhout, Y.V., van Emst, J.L., Bakker, H.H., Preijers, F.W., Schattenberg, A.V., Ruiter, D.J., Evers, S., Koopman, J.P., y de Witte, T. (2001). Production of anti-CD3 and anti-CD7 ricin A-immunotoxins for a clinical pilot study. *Int. J. Pharm.* 221, 175–186.
- Papac, D.I., Hoyes, J., y Tomer, K.B. (1994). Epitope mapping of the gastrin-releasing peptide/anti-bombesin monoclonal antibody complex by proteolysis followed by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Protein Sci.* 3, 1485–1492.
- Park, L.S., Martin, U., Garka, K., Gliniak, B., Di Santo, J.P., Muller, W., Largaespada, D.A., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Farr, A.G., et al. (2000). Cloning of the murine thymic stromal

lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *J. Exp. Med.* 192, 659–670.

Paus, D., y Winter, G. (2006). Mapping epitopes and antigenicity by site-directed masking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9172–9177.

Poirier, N., Haudebourg, T., Brignone, C., Dilek, N., Hervouet, J., Minault, D., Coulon, F., de Silly, R.V., Triebel, F., Blancho, G., et al. (2011). Antibody-mediated depletion of lymphocyte-activation gene-3 (LAG-3(+)) -activated T lymphocytes prevents delayed-type hypersensitivity in non-human primates. *Clin. Exp. Immunol.* 164, 265–274.

Racapé, M., Vanhove, B., Soullillou, J.-P., y Brouard, S. (2009). Interleukin 7 receptor alpha as a potential therapeutic target in trasplant. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 57, 253–261.

Rader, C., Cheresch, D.A., y Barbas, C.F. (1998). A phage display approach for rapid antibody humanization: designed combinatorial V gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8910–8915.

Reche, P.A., Soumelis, V., Gorman, D.M., Clifford, T., Liu Mr, null, Travis, M., Zurawski, S.M., Johnston, J., Liu, Y.J., Spits, H., et al. (2001). Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 336–343.

Risberg, K., Fodstad, Ø., y Andersson, Y. (2011). Synergistic anticancer effects of the 9.2.27PE immunotoxin and ABT-737 in melanoma. *PloS One* 6, e24012.

Roan, F., Bell, B.D., Stoklasek, T.A., Kitajima, M., Han, H., y Ziegler, S.F. (2012). The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. *J. Leukoc. Biol.* 91, 877–886.

Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., y Leonard, W.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19455–19460.

Rosok, M.J., Yelton, D.E., Harris, L.J., Bajorath, J., Hellström, K.E., Hellström, I., Cruz, G.A., Kristensson, K., Lin, H., Huse, W.D., et al. (1996). A combinatorial library strategy for the rapid humanization of anticarcinoma BR96 Fab. *J. Biol. Chem.* 271, 22611–22618.

Schlehuber, S., Skerra, A. (2002). Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant -- a so-called 'anticalin' -- using a molecular random approach. *Biophys Chem.* 2002 May 2;96(2-3):213-28

Shaw, A.S., y Dustin, M.L. (1997). Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6, 361–369.

- Shinohara, T., Nemoto, Y., Kanai, T., Kameyama, K., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Totsuka, T., Ikuta, K., y Watanabe, M. (2011). Upregulated IL-7 receptor α expression on colitogenic memory CD4⁺ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 2623–2632.
- Shochat, C., Tal, N., Bandapalli, O.R., Palmi, C., Ganmore, I., te Kronnie, G., Cario, G., Cazzaniga, G., Kulozik, A.E., Stanulla, M., et al. (2011). Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J. Exp. Med.* **208**, 901–908.
- Skerra, A. (2008). Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J.* 2008 Jun;**275**(11):2677-83. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06439.x. Epub 2008 Apr 24.
- Suckau, D., Köhl, J., Karwath, G., Schneider, K., Casaretto, M., Bitter-Suermann, D., y Przybylski, M. (1990). Molecular epitope identification by limited proteolysis of an immobilized antigen-antibody complex and mass spectrometric peptide mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 9848–9852
- Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., y Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* **206**, 655–667.
- Teeling, J.L., Mackus, W.J.M., Wiegman, L.J.J.M., van den Brakel, J.H.N., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., et al. (2006). The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 362–371.
- Timmerman, P., Puijk, W.C., y Meloen, R.H. (2007). Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS technology. *J. Mol. Recognit. JMR* **20**, 283–299.
- Walsh, S.T.R. (2012). Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway. *Immunol. Rev.* **250**, 303–316.
- Watanabe, N., Wang, Y.-H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.-H., Cao, W., y Liu, Y.-J. (2005a). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* **436**, 1181–1185.
- Watanabe, N., Hanabuchi, S., Marloie-Provost, M.-A., Antonenko, S., Liu, Y.-J., y Soumelis, V. (2005b). Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. *Blood* **105**, 4749–4751.

Ye, J., Ma, N., Madden, T.L., y Ostell, J.M. (2013). IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic acids Res.* 41, W34–W40.

Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Fang, C., Cousins, D., Zhang, G., Gu, S., Gao, Z., Shamji, B., et al. (2008). Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 2790–2798.

Zhi, K., Li, M., Zhang, X., Gao, Z., Bai, J., Wu, Y., Zhou, S., Li, M., y Qu, L. (2014). $\alpha 4\beta 7$ Integrin (LPAM-1) is upregulated at atherosclerotic lesions and is involved in atherosclerosis progression. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 33, 1876–1887.

Zhong, J., Sharma, J., Raju, R., Palapetta, S.M., Prasad, T.S.K., Huang, T.-C., Yoda, A., Tyner, J.W., van Bodegom, D., Weinstock, D.M., et al. (2014). TSLP signaling pathway map: a platform for analysis of TSLP-mediated signaling. *Database J. Biol. Databases Curation* 2014, bau007.