

MOLÉCULAS DE UNIÓN A LINFOPOYETINA ESTROMAL TIMICA (TSLP) Y MÉTODOS DE USO DE LAS MOLÉCULAS

CAMPO TÉCNICO

5 [001] La presente invención proporciona moléculas, ej., anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que fijan específicamente linfopoyetina estromal tímica (TSLP), composiciones que comprenden estas moléculas, y métodos de uso y producción de estas moléculas.

FUNDAMENTO

10 [002] La linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es una citoquina que envía señales a través de un receptor heterodimérico que consiste en la subunidad IL-7R α y TSLP-R, un componente único con homología con la cadena tipo γ -receptor común (Pandey, Nat. Immunol. 1(1):59-64). TSLP se expresa por las células epiteliales en el timo, pulmón, piel, intestino, y las amígdalas, así como
15 las células del músculo liso de las vías respiratorias, fibroblastos pulmonares y las células del estroma (Edwards, 2008, Drug news & perspectives 21, 312-316; He y Geha, 2010, Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York 1183, 13-24; Reche, 2001, Journal of Immunology 167, 336-343). Estas células producen TSLP en respuesta a los estímulos proinflamatorios, y TSLP impulsa las
20 respuestas inflamatorias alérgicas a través de su actividad en una serie de células inmunes innatas, incluyendo células dendríticas (Soumelis, 2002, Nature Immunology 3.673-680), monocitos (Reche, 2001, Journal of Immunology 167, 336-343), y los mastocitos (Allakhverdi, 2007, El Diario de Medicina Experimental 204, 253-258). Las poblaciones de células con la expresión más alta conocida
25 tanto de TSLP-R y IL-7R α son células dendríticas mieloides (Reche, 2001, Journal of Immunology 167, 336-343).

 [003] TSLP puede promover la proliferación de células T vírgenes y conducir su diferenciación en células Th2 que expresan altos niveles de IL-4, IL-5, y IL-13 (Omori y Ziegler, 2007, Journal of Immunology 178, 1396-1404). Se
30 ha encontrado un alto nivel de expresión de TSLP en células epiteliales de pulmón de asmáticos y lesiones de dermatitis atópica crónica, lo que sugiere un papel para TSLP en inflamación alérgica (Ziegler y Artis, 2010, Nature

Immunology 11, 289-293). Evidencia más reciente implica TSLP en la diferenciación de células Th17 y procesos inflamatorios promovidos por Th17 (Hartgring, 2011, Artritis y Reumatismo 63, 1878-1887; Tanaka, 2009, Alergia Clínica y Experimental. Revista de la Sociedad Británica de Alergia e Inmunología Clínica 39, 89-100; Wu et al., 2014, Revista de Cardiología Molecular y Celular 76, 33-45). El asma alérgica crónica (atópica) se caracteriza a menudo por la inflamación de tipo Th2, mientras que la inflamación asmática no alérgica es predominantemente neutrofílica con un medio de citoquinas mixto Th1 y Th17. Las consecuencias de la inflamación crónica en el asma incluyen la hiperreactividad bronquial (HRB), la sobreproducción de moco, remodelación de la pared de las vías respiratorias y el estrechamiento de las vías respiratorias (Lambrecht y Hammad, 2014, Nature immunology 16, 45-56). TSLP ha demostrado estar implicado en la iniciación y el mantenimiento/mejora de la respuesta asmática alérgica (Wang, 2006, Inmunidad 24, 827-838). Más recientemente, se descubrió que se requiere de la señalización de TSLP para la respuesta de memoria de las células T frente al desafío del antígeno local. (Wang et al., 2015, The Journal of allergy and clinical immunology 135, 781-791 e783).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[004] En un aspecto, se proporcionan en la presente moléculas, ej., anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos de los mismos tales como Fab, Fab', F (ab')₂, scFv, minicuerpo, o diacuerpo, que se unen específicamente a linfopoyetina estromal tímica humana (TSLP). En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP pueden comprender: una región determinante de complementariedad 1 de cadena pesada (CDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; una región determinante de complementariedad 2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; una región determinante de complementariedad 3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; una región determinante de complementariedad 1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; una región determinante de complementariedad 2 de cadena ligera (LCDR2) que

comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una región determinante de complementariedad 3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP pueden comprender: una molécula
5 que comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 6; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 14; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la
10 SEC ID NO: 15; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 16.

[005] En algunas modalidades específicas, la molécula comprende un fragmento de anticuerpo que se une a TSLP humano y comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una HCDR2
15 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 12; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 13. En otras
20 modalidades específicas, la molécula comprende un fragmento de anticuerpo que se une a TSLP humano y comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 6; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la
25 secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 14; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 15; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 16.

[006] En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP pueden comprender: una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia
30 de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 17.

[007] En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP pueden comprender: una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 25. En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP pueden comprender: una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 19.

[008] En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP pueden comprender un paratopo que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, o la totalidad de los siguientes residuos: Thr28, Asp31, Tyr32, Trp33, Asp56, Glu101, Ile102, Tyr103, Tyr104, Tyr105 de una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 22 o Gly28, Ser29, Lys30, Tyr31, Tyr48, Asp50, Asn51, Glu52, Asn65, y Trp92 de una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 25.

[009] En algunas modalidades, se proporcionan en la presente las moléculas que se unen específicamente a un epítipo en TSLP humana, en donde el epítipo comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, o la totalidad de los siguientes residuos: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Lys101, Gln145, y Arg149 de la SEC ID NO: 38. En algunas modalidades, tales moléculas se unen a un epítipo que comprende al menos uno de los siguientes conjuntos de residuos de SEQ ID NO: 38: (a) Lys49 y Ile52, (b) Gly57 y Lys59, (c) Lys101, o (d) Gln145 y Arg149.

[0010] En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP son inmunoglobulinas humanas que se unen específicamente a TSLP humana. En algunas modalidades, las moléculas de unión de TSLP son anticuerpos monoclonales o un fragmento de anticuerpo seleccionado de un Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, minicuerpo, o diacuerpo. En algunas modalidades, las moléculas

de unión a TSLP son Fabs, por ejemplo, Fabs humanos o humanizados, que se unen específicamente a TSLP humana.

[0011] En algunas modalidades, las moléculas descritas en el presente documento se unen a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de
5 menos de 100 pM. En algunas modalidades, las moléculas descritas en el presente documento se unen a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 10 pM.

[0012] En otro aspecto, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una molécula de unión
10 a TSLP descrita en este documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la relación de excipiente a masa de molécula de unión a TSLP es mayor de 0.5. En algunas modalidades, la molécula de unión a TSLP es de 5% a 95% aproximadamente, o 10% a 90% aproximadamente, o 15% a 85% aproximadamente, o 20% a 80%
15 aproximadamente, o 25% a 75% aproximadamente, o 30% a 70% aproximadamente, o 40% a 60% aproximadamente, o 40 a 50% aproximadamente (peso/peso) de la composición farmacéutica. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas comprenden un agente formador de revestimiento, tal como trileucina o leucina. En algunas modalidades, la
20 trileucina o leucina es de 10 a 75% aproximadamente (peso/peso) de la composición. En algunas modalidades, la trileucina es 10 a 30% aproximadamente (peso/peso) de la composición. En otra modalidad, la leucina es de 50 a 75% aproximadamente (peso/peso) de la composición. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un
25 excipiente formador de la matriz, en donde el excipiente formador de la matriz se selecciona de entre histidina, trehalosa, manitol, sacarosa, o citrato de sodio. En algunas modalidades, al menos un excipiente formador de la matriz es trehalosa o una mezcla de trehalosa y manitol. En algunas modalidades, el excipiente formador de la matriz es de aproximadamente 15 a 35% (peso/peso) de la
30 composición. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas comprenden un agente tampón, tal como un agente tampón de histidina, glicina,

acetato, o fosfato. En algunas modalidades, el agente tampón es de 5- 13% aproximadamente de la composición.

[0013] En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento se formulan como una formulación de polvo seco, ej., una formulación de polvo seco adecuada para la inhalación.

[0014] En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento comprenden partículas pulverizadas que comprenden un revestimiento y un núcleo, en donde el revestimiento comprende trileucina o leucina, y el núcleo comprende: (i) la molécula de unión a TSLP, trehalosa, manitol y un agente tampón; o (ii) la molécula de unión a TSLP, trehalosa, agente tampón, y HCl. El agente tampón puede ser un agente tampón de histidina, glicina, acetato, o fosfato.

[0015] En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento comprenden partículas pulverizadas que comprenden: (i) un revestimiento que comprende trileucina o leucina; y (ii) un núcleo que comprende trehalosa, manitol, histidina, y una molécula de unión a TSLP, o un núcleo que comprende trehalosa, histidina, HCl, y una molécula de unión a TSLP, en donde la molécula de unión a TSLP es un fragmento Fab de anticuerpo que comprende: bien sea (a) una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 12; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 13; o (b) una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5 y una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 6; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 14; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 15; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 16.

[0016] En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento comprenden:

- 5 (a) molécula de unión a TSLP al 40% (peso/peso), trileucina al 25% (peso/peso), peso combinado de trehalosa y manitol al 30% (peso/peso), e histidina al 5% (peso/peso);
- b) molécula de unión a TSLP al 50% (peso/peso), trileucina al 15% (peso/peso) , HCl al 2.6% (peso/peso), histidina al 5.6% (peso/peso), y peso combinado de trehalosa y y una base al 26.8% (peso/peso); o
- 10 c) molécula de unión a TSLP al 50% (peso/peso), trileucina al 15% (peso/peso) , trehalosa al 19.4% (peso/peso), histidina al 13.04% (peso/peso), y HCl al 2.56% (peso/peso).

[0017] También se proporcionan en este documento ácidos nucleicos que codifican cualquier molécula de unión a TSLP descrita en este documento, vectores que comprenden tales ácidos nucleicos, y células huésped que
15 comprenden el ácido nucleico o el vector.

[0018] También se proporcionan métodos de producción de la molécula de unión a TSLP descrita en este documento. Tales métodos pueden incluir (a) cultivar una célula huésped que expresa un ácido nucleico que codifica la molécula; y (b) recolectar la molécula desde el medio de cultivo.

20 [0019] En otro aspecto, se proporcionan en la presente kits que comprenden al menos una molécula de unión a TSLP o composición farmacéutica descrita en el presente documento, y un dispositivo para la administración de la molécula o composición farmacéutica a un sujeto. En algunas modalidades, el dispositivo puede administrar la molécula o composición
25 farmacéutica en una forma de aerosol. En algunas modalidades, el dispositivo es un inhalador de polvo seco.

[0020] En otro aspecto, se proporcionan en este documento métodos de tratamiento de una condición relacionada con TSLP en un sujeto en necesidad del mismo, ej., un paciente humano, mediante la administración al sujeto de una
30 cantidad terapéuticamente eficaz de cualquier molécula de unión a TSLP o composición farmacéutica descrita en este documento. También se

- proporcionan moléculas o composiciones farmacéuticas como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de una condición relacionada con TSLP en un sujeto en necesidad del mismo. También se incluye el uso de las moléculas de unión a TSLP-o composición farmacéutica descritas en este
- 5 documento para el tratamiento de una condición relacionada con TSLP en un sujeto en necesidad del mismo. La presente descripción también incluye el uso de la molécula descrita en este documento en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una condición relacionada con TSLP en un sujeto en necesidad del mismo.
- 10 [0021] La condición inflamatoria relacionada con TSLP puede ser cualquiera entre asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rinitis alérgica, rinosinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, esofagitis eosinofílica, o dermatitis atópica. En algunas modalidades, la condición inflamatoria relacionada con TSLP es asma. En algunas modalidades, la molécula de unión a TSLP se
- 15 formula como una formulación en polvo seco adecuada para inhalación. En algunas modalidades, la molécula de unión a TSLP se administra al sujeto por vía oral o por vía intranasal, ej., en una forma de aerosol. En algunas modalidades, la molécula de unión a TSLP se administra al sujeto por un inhalador de polvo seco.
- 20 [0022] En algunas modalidades, los métodos de tratamiento de una condición relacionada con TSLP o usos de la molécula de unión a TSLP incluyen además la administración de un segundo agente al sujeto en necesidad de tratamiento. El segundo agente puede ser un corticosteroide, broncodilatador, antihistamína, antileucotrieno, o un inhibidor de la PDE-4.
- 25 [0023] En otro aspecto, se proporcionan en la presente, métodos para la fabricación de una formulación de polvo seco que comprende la molécula de unión a TSLP descrita en este documento. Tales métodos pueden incluir uno o más de los siguientes pasos: (a) proporcionar una solución acuosa que comprende una molécula de unión a TSLP como se describe en el presente
- 30 documento, trileucina o leucina, un excipiente formador de la matriz, y un agente tampón; (b) pulverizar la solución acuosa de la etapa (a) a una temperatura entre un rango de 120°C a 200°C aproximadamente (entrada) y 55°C a 75°C

aproximadamente (salida) para producir partículas de polvo seco; y (c) recolectar las partículas de polvo seco. En algunas modalidades, el buffer se selecciona de un buffer de histidina, glicina, acetato, o fosfato. En algunas modalidades, el excipiente formador de la matriz se selecciona de entre histidina, HCl de histidina, trehalosa, manitol, sacarosa, o citrato de sodio.

[0024] Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción a continuación. Otras características, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025] La Fig. 1A muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de TSLP Fab1 anti-humana (SEQ ID NO: 22) con las CDR subrayadas (como se define por Kabat), y los residuos situados en la interfaz de anticuerpo-antígeno marcados con *. La Fig. 1B muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de TSLP Fab1 anti-humana (SEQ ID NO: 25) con las CDRs subrayadas (como se define por Kabat), y los residuos situados en la interfaz de anticuerpo-antígeno marcados con *.

[0026] La Fig. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de TSLP humana recombinante utilizada en estudios de cristalografía (SEQ ID NO: 38), con los elementos de estructura secundaria mostrados debajo de la secuencia de aminoácidos. Los cuadros representan las alfa-hélices α_A , α_B , α_C y α_D , y las líneas gruesas representan las regiones de bucle. TSLP humana madura comienza a partir de Tyr29. El constructo utilizado en la presente tuvo una etiqueta de hexahistidina N-terminal (SEQ ID NO: 40) (residuos 15-20) seguido de un sitio de reconocimiento de HRV-3C proteasa (PreScission) (residuos 21-28) y residuos 11-14 resultantes de la clonación. Asn64 y Asn119 son posibles sitios de glicosilación N-ligada; y los residuos 127-130 constituyen el sitio de escisión de furina.

[0027] La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra el efecto de la neutralización de TSLP sobre la inflamación pulmonar en ratones sensibilizados con ovoalbúmina que fueron inoculados con el antígeno. Los ratones

sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) o solución salina más alumbre, recibieron una administración intravenosa de bien sea TSLP antimurino o anticuerpo de control de isotipos 1h antes de las sensibilizaciones. Todos los ratones fueron expuestos a OVA el día 21 y sacrificados a las 24 h. Los valores representan la media $\pm$ EME (Error Medio Estándar) total y los conteos celulares diferentes dentro del BAL. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student no pareada. Las diferencias significativas entre ratones del isotipo tratados con salina sensibilizados y ratones sensibilizados con OVA en $p < 0.05$ se representan por (*) y $p < 0.01$ se representan por (**). Las diferencias significativas entre ratones del isotipo y ratones sensibilizados con OVA tratados con el anticuerpo anti-TSLP en $p < 0.05$ se representan por (#). [PMN: Células polimorfonucleares (neutrófilos); Eos: Eosinófilos; MO: monocitos; Linfa: Linfocitos; TCC: Recuento total de células.]

[0028] Las Figs. 4A-4C son una serie de gráficos de barras que muestran que la neutralización de TSLP atenúa significativamente los niveles de IL-13 (Fig. 4A), eotaxina-2 (CCL24, la Fig. 4B) y la quimiocina de Timo y Activación Regulada (TARC, CCL17, Fig. 4C) dentro del pulmón de los ratones sensibilizados con ovalbumina enfrentados a antígeno. Los ratones sensibilizados con OVA (o solución salina) más alumbre, recibieron una administración intravenosa de bien sea TSLP antimurino o anticuerpo de control de isotipos 1h antes de las sensibilizaciones. Todos los ratones fueron expuestos a OVA el día 21 y sacrificados a las 24 h. Los valores representan la media $\pm$ EME de los niveles de mediadores en el BAL, medidos por ELISA específica. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student no pareada. Las diferencias significativas entre ratones del isotipo tratados con salina sensibilizados y ratones sensibilizados con OVA en $p < 0.05$ se representan por (*) y $p < 0.01$ se representan por (**). Las diferencias entre ratones del isotipo y ratones sensibilizados con OVA tratados con el anticuerpo anti-TSLP en $p < 0.05$ se representan por (#).

[0029] La FIG. 5 es un gráfico lineal que muestra los perfiles medios de concentración-tiempo de suero de Fab1 anti-TSLP total en monos.

[0030] Las Figs. 6A y 6B son gráficos de barras que muestran las concentraciones medias del Fab1 anti-TSLP total en BAL (6A) un homogenado de pulmón (6B) en monos en 1 hora (grupos de inhalación de 1, 10, 20 mg/kg/día) o 6 días (grupo de inhalación de 1 mg/ kg iv + 20 mg/kg/día) ddespués de la
5 última dosis inhalada.

[0031] La FIG. 7 ilustra una visión general de TSLP humana en complejo con Fab1 anti-TSLP. Las hélices TSLP se marcaron de A a D a partir del extremo N- a C-terminal.

[0032] La figura 8 muestra el epítopo TSLP dirigido por Fab1 anti-TSLP.
10 La parte superior de la figura muestra el número de contactos intermoleculares directos entre los átomos que no son hidrógeno dentro 4.0Å de distancia, y la parte inferior muestra la reducción en la superficie accesible al solvente después de la formación del complejo. La secuencia de aminoácidos de la TSLP (SEQ ID NO: 41) se muestra en el eje horizontal.

15 [0033] La Fig. 9 muestra la vista de anticuerpos del epítopo TSLP. Se muestra la TSLP en una representación animada tipo cinta. Todos los residuos de aminoácidos involucrados en los contactos directos con el Fab1 (distancia de corte de 4.0Å) se muestran en una representación de bolas y barras.

[0034] Las Figs. 10A y 10B muestran el paratopo de cadena pesada (A)
20 (SEQ ID NO: 42) y cadena ligera (B) (SEQ ID NO: 43) de Fab1 anti-TSLP. La parte superior de la figura muestra el número de contactos intermoleculares directos ($\leq 4.0 \text{ Å}$) entre los átomos que no son hidrógeno, la parte inferior muestra la reducción de la superficie accesible al disolvente tras la formación de complejos. La secuencia de amino-ácidos del dominio variable de cadena
25 pesada o ligera se muestra en el eje horizontal.

[0035] Las Figs. 11A-11C muestran el modo de acción de Fab1 anti-TSLP. La FIG. 11A es una vista del complejo de señalización extracelular de ratón, con IL-7Rα en negro, y TSLPR en gris claro. La FIG. 11B es una vista del complejo TSLP-Fab1 humano en la misma orientación que la figura 11A. La FIG. 11C es
30 la superposición estructural de los dos complejos, con base en los átomos de

citoquina Cα. El complejo de señalización de ratón está en gris claro, el complejo TSLP-Fab1 humano está en negro.

[0036] La FIG. 12 es un diagrama de dispersión que ilustra que las formulaciones en relaciones mayores excipiente: proteína mejoran la estabilidad fisicoquímica de Fab1 anti-TSLP, como se muestra por la reducción en la tasa de agregación de proteínas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

[0037] Como se utiliza en la especificación y las reivindicaciones, la forma singular "uno", "una" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de las mismas.

[0038] Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluyendo los rangos, son aproximaciones que son variadas (+) o (-) en incrementos de 0.1. Se debe entender, aunque no siempre se declara explícitamente que todas las designaciones numéricas son precedidas por el término "aproximadamente". También se ha de entender, aunque no siempre se declara explícitamente, que los reactivos descritos en la presente son meramente ejemplos y que los equivalentes de tales se conocen en la técnica.

[0039] Como se usa en este documento, "TSLP" (también conocido como "linfopoyetina estromal tímica") se refiere a una citoquina producida por células no hematopoyéticas en respuesta a los estímulos proinflamatorios. El gen de TSLP humana se mapea a la localización cromosómica 5q22.1, y la secuencia genómica del gen TSLP se pueden encontrar en GenBank en NC_000005.10. Debido al splicing alternativo, dos isoformas de TSLP están presentes en el ser humano. Las secuencias de proteínas y de ARNm para las dos isoformas TSLP humanas se enumeran en la Tabla 1.

TABLA 1. Secuencias de aminoácidos y de ARNm de TSLP

Especies	Isoforma	No. de Acceso GeneBank	Secuencia
Homo sapiens	Aminoácidos de la isoforma 1 de TSLP	NP_149024.1	MFPFALLYVLSVSFRKIFILQLVGLVLTIDFTNC DFEKIKAAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVS CSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAM KTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRRKRKV TTNKCLEQVSQQLQGLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 27)
Homo sapiens	ARNm de la isoforma 1 de TSLP	NM_033035.4	GCAGCCAGAA AGCTCTGGAG CATCAGGGAG ACTCCAACCTT AAGGCAACAG CATGGGTGAA TAAGGGCTTC CTGTGGACTG GCAATGAGAG GCAAAACCTG GTGCTTGAGC ACTGGCCCCCT AAGGCAGGCC TTACAGATCT CTTACACTCG TGGTGGGAAG AGTTTAGTGT GAAACTGGGG TGGAATTGGG TGTCCACGTA GTTCCCTTT TGCCTTACTA TATGTTCTGT CAGTTTCTTT CAGGAAAATC TTCATCTTAC AACTTGTAGG GCTGGTGTTA ACTTACGACT TCACTAACTG TGACTTTGAG AAGATTAAAG CAGCCTATCT CAGTACTATT TCTAAAGACC TGATTACATA TATGAGTGGG ACCAAAAGTA CCGAGTTCAA CAACACCGTC TCTTGTAGCA ATCGGCCACA TTGCCTTACT GAAATCCAGA GCCTAACCTT CAATCCCACC GCCGGCTGCG CGTCGCTCGC CAAAGAAATG TTCGCCATGA AAATAAGGC TGCCTTAGCT ATCTGGTGCC CAGGCTATTC GGAACTCAG ATAAATGCTA CTCAGGCAAT GAAGAAGAGG AGAAAAAGGA AAGTCACAAC CAATAAATGT CTGGAACAAG TGTCACAATT ACAAGGATTG TGGCGTCGCT TCAATCGACC TTTACTGAAA CAACAGTAAA CCATCTTTAT TATGGTCATA TTTCACAGCA CCAAATAAA TCATCTTTAT TAAGTAGATG AACATTAAC TCTAACTGTG ACAAAGAAGA CCACAAATAG TTATCTTTTA ATTACAGAAG AGTTTCTTAA CTTACTTTTG TAAGTTTTTA TTGTGTAAGT TTATAATGCA GGGGAAGTAC TACTCCTCAA ATGTTGAGGG AAGCTTCCAT AACATTGATG ACTGGCTTCA TGGCAGTAAT TCTCGGCTGT AGTTGCATAA GCATTGCTCA AGAGGAAAAT CCAAAAGTGC AGCAGGAGAA CTCTTTTCCC TGAAAAAGGA AAAATATTGA ACTCAATGAT AGCACCTAAA CTTACATTTA AAAGACAGAC ATTCCTTCTA CATGTAATGA CACTTCTTGT GTTAACTAA AAATTTACAA GAGAAGAAAG TGAAAGCAAA TGGGGTTTCA CAAATAGTTG TAAATATAGT GAAGCAATTT GAAATAATTT TCAAGCAAAG TATTGTGAAA GTATTCTAAG CCAAGTTTTA AATATTATCT AACAGACAAG AGTGGTATAT ACAAGTAGAT CCTGAGAAGT ACCTTTGTTA CAGCTACTAT AAATATACAT

			ATAAATTATA GAATCTACTT TAATTTATTT TGTGAACACT TTTGAAAATG TACATGTTCC TTTGTAATTG ACACTATATA TTTCTTAATA AAATAATTCT CAAATTTGTT TCTTATGAAT CATCTCTCAA ATCTAGTTAG ACAATTTGCA CACATACTTT TCTAAGGGAC ATTATCTTCC TTCAGGTTTT TACCTCCACT CATCCTTAGA GCCCACTGAC TGCTCCCCTT TATACCTGTT GGCCCTGCCT ATAGGAGAGA ATATTTGGAG ATAGGCAGCT TCAGGATGCA TTGCAATCAT CCTTTTCTTA AATTATGTCA CTAGTCTTTT ATTTTTTCCC CTCTTGAAC TCCCTCACAC CTGGAAGAAA CAAAGTAGGA AAAAGTGAAC AGGGGATGTC AAATCGATT TGAATTCCC GCTGCAAGCT AGAGCCGCAG GCACCCCTCTC ACTCAATTC CACTCAGAAC CCTATAAACA CCAGTGGGAA GGGCAACCCA CTGCACGTGG GAATGCACTG ATTTTTCCTA GGAGTAGACA TGTTCTCTA ATTACTCCCT GAGGGTTAGT TGGGGCTAAA CCATGACAGA AGTGGGGAAG TTCAATGTCC TTAAATCCAT CTTACTTGCC AACAGGTAAG AGGAAGCTTA CATTACATGT CCAGTCCACA TTTAAAGAGC ACTTACTGTG GAACAAGCCT TCAGCCAAAC AATGGGGATA GAAAAGTAGG TAAGACTCAG CCTTTGTCCA GAGAAGCTCA GGGTATAGCT GAATAGGCAG TTTCTTTTGT CCTGAGGAAA ATCAGGACAT GCCTGCTTTC TAAAAATCTT CCTCTGAAGA CCTGACCCAA GCTCTTAAAT GCTATTGTAA GAGAAATTC TTTGTCTATT AACTCCATTT TAGTAGGGAT TCACTGACTA GATTTTACTG AACTATGAAA ATAAATACAC ATAATTTTTT ACAAATTTT GGGCCCAATT CCCCTAAAAG AATTGAGGAT TAGGGAGAAA GGAGACAAC CAAAGTCATC CCATTAAGTG CAGTTTCTTT GAATCTTCTG CTTTATCTTT AAAAAATTTGT ATAATTTATA TATTTTATTC TATGTGTTCC ATAGATATCT TAATGTAAAA TTAGTCATTT AAATTACACT GTCAATTAAA AGTAATGGGC AAGAGATTGC ATCATACTAA TTTAGTAAGA ACGTTCCCAA ATGTTGTAAC AATGTGGATC ATACATCTCT GGTTTTTTAA ATGTATTGAG GCTTTCTTGG TGGACTAGTA TAGTATACGG TCAGTTATGT CAATGTTTCA TGGTCAATAA AAAGGAAGTT GCAAATTGT (SEQ ID NO: 28)
Homo sapiens	Aminoácidos de la isoforma 2 de TSLP	NP_612561.2	MFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRR KRKVTTNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 29)

Homo sapiens	ARNm de la isoforma 2 de TSLP	NM_138551.4	ACCCTCGCCA CGCCCCTGCT CCCCCGCGGT TGGTTCTTCC TTGCTCTACT CAACCCTGAC CTCTTCTCTC TGACTCTCGA CTTGTGTTCC CCGCTCCTCC CTGACCTTCC TCCCCTCCCC TTTCACTCAA TTCTCACCAA CTCTTTCTCT CTCTGGTGTT TTCTCCTTTT CTCGTAAACT TTGCCGCCTA TGAGCAGCCA CATTGCCTTA CTGAAATCCA GAGCCTAACC TTCAATCCCA CCGCCGGCTG CGCGTCGCTC GCCAAAGAAA TGTTCGCCAT GAAAACTAAG GCTGCCTTAG CTATCTGGTG CCCAGGCTAT TCGGAAACTC AGATAAATGC TACTCAGGCA ATGAAGAAGA GGAGAAAAAG GAAAGTCACA ACCAATAAAT GTCTGGAACA AGTGTCAACA TTACAAGGAT TGTGGCGTCG CTTCAATCGA CCTTTACTGA ACAACAGTA AACCATCTTT ATTATGGTCA TATTTACAG CACCAAAATA AATCATCTTT ATTAAGTAGA TGAAACATTA ACTCTAACTG TGACAAAGAA GACCACAAAT AGTTATCTTT TAATTACAGA AGAGTTTCTT AACTTACTTT TGTAAGTTTT TATTGTGTAA GTTTATAATG CAGGGGAAGT ACTACTCCTC AAATGTTGAG GGAAGCTTCC ATAACATTGA TGA CTGGCTT CATGGCAGTA ATTCTCGGCT GTAGTTGCAT AAGCATTGCT CAAGAGGAAA ATCCAAAAGT GCAGCAGGAG AACTCTTTTC CCTGAAAAAG GAAAAATATT GAACTCAATG ATAGCACCTA AACTTACATT TAAAAGACAG ACATTCCCTC TACATGTAAT GACACTTCTT GTGTTAAACT AAAAATTTAC AAGAGAAGAA AGTGAAAGCA AATGGGGTTT CACAAATAGT TGTAATATA GTGAAGCAAT TTGAAATAAT TTTCAAGCAA AGTATTGTGA AAGTATTCTA AGCCAAGTTT TAAATATTAT CTAACAGACA AGAGTGGTAT ATACAAGTAG ATCCTGAGAA GTACCTTTGT TACAGCTACT ATAAATATAC ATATAAATTA TAGAATCTAC TTAAATTTAT TTTGTGAACA CTTTTGAAAA TGTACATGTT CCTTTGTAAT TGACACTATA TATTTCTTAA TAAATAAATT CTCAAATTTG TTTCTTATGA ATCATCTCTC AAATCTAGTT AGACAATTTG CACACATACT TTTCTAAGGG ACATTATCTT CCTTCAGGTT TTTACCTCCA CTCATCCTTA GAGCCCACTG ACTGCTCCCC TTTATACCTG TTGGCCCTGC CTATAGGAGA GAATATTTGG AGATAGGCAG CTTCAGGATG CATTGCAATC ATCCTTTTCT TAAATTATGT CACTAGTCTT TTATTTTTTC CCCTCTTGAA CTTTCCTCAC ACCTGGAAGA AACAAAGTAG GAAAAAGTGA ACAGGGGATG TCAAATCGAT TCTTGAATTC CCGCTGCAAG CTAGAGCCGC AGGCACCCTC TCACTCAATT TCCACTCAGA ACCCTATAAA CACCAGTGGG AAGGGCAACC CACTGCACGT GGAATGCAC
--------------	-------------------------------	-------------	---

			TGATTTTTCC TAGGAGTAGA CATGTTCCCTC TAATTACTCC CTGAGGGTTA GTTGGGGGCTA AACCATGACA GAAGTGGGGA AGTTCAATGT CCTTAAATCC ATCTTACTTG CCAACAGGTA AGAGGAAGCT TACATTACAT GTCCAGTCCA CATTTAAAGA GCACTTACTG TGGAAACAAGC CTTCAGCCAA ACAATGGGGA TAGAAAAGTA GGTAAGACTC AGCCTTTGTC CAGAGAAGCT CAGGGTATAG CTGAATAGGC AGTTTCTTTT GTCCTGAGGA AAATCAGGAC ATGCCTGCTT TCTAAAAATC TTCCTCTGAA GACCTGACCC AAGCTCTTAA ATGCTATTGT AAGAGAAATT TCTTTGTCTA TTAACCTCAT TTTAGTAGGG ATTCACTGAC TAGATTTTAC TGAACATATGA AAATAAATAC ACATAATTTT TCACAAAATT TTGGGCCCAA TTCCCCTAAA AGAATTGAGG ATTAGGGAGA AAGGAGACAA CTCAAAGTCA TCCCATTAAAG TGCAGTTTCT TTGAATCTTC TGCTTTATCT TTAAAAATTT GTATAATTTA TATATTTTAT TCTATGTGTT CCATAGATAT CTTAATGTAA AATTAGTCAT TTAAATTACA CTGTCAATTA AAAGTAATGG GCAAGAGATT GCATCATACT AATTTAGTAA GAACGTTCCC AAATGTTGTA ACAATGTGGA TCATACATCT CTGGTTTTTT AAATGTATTG AGGCTTTCTT GGTGGACTAG TATAGTATAC GGTCAGTTAT GTCAATGTTT CATGGTCAAT AAAAAGGAAG TTGCAAATTG T (SEQ ID NO: 30)
Mcaco	Aminoácido TSLP.		YDFTNCDFEKIEADYLRTISKDLITYMSGTKSTD FNNTVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTPRCASLAK EMFARKTKATLALWCPGYSETQINATQAMKKR RKRKVTTNKCLEQVSQLLGLWRRFIRTLKKQ (SEQ ID NO: 31)
Mcaco	ARNm de TSLP		TACGACTTCACCAACTGCGACTTCGAGAAGA TCGAGGCCGACTACCTGAGAACCATCAGCAA GGACCTGATCACCTACATGAGCGGCACCAAG AGCACCGACTTCAACAACACCGTGTCTGCA GCAACAGACCCCACTGCCTGACCGAGATCCA GAGCCTGACCTTCAACCCCAACCCCAAGATGT GCCAGCCTGGCCAAAGAGATGTTGCGCCAGA AAGACCAAGGCCACCCTGGCCCTGTGGTGT CCCGGCTACAGCGAGACACAGATCAACGCC ACACAGGCCATGAAGAAGCGGCGGAAGCGG AAAGTGACCACCAACAAGTGCCTGGAACAGG TGTCACAGCTGCTGGGGCTGTGGCGGCGGT TCATCCGGACCCTGCTGAAGAAGCAG (SEQ ID NO: 32)
Mus musculus	Aminoácidos de la	NP_067342.1	MVLLRSLFILQVLVRMGLTYNFSNCNFTSITKIY CNIIFHDLTGDLKGAKFEQIEDCESKPACLLKIE YYTLNPIPGCPSLPDKTFARRTREALNDHCPGY

	isoforma 1 de TSLP		PETERNDGTQEMAEVQNICLNQTSQILRLWY SFMQSPE (SEQ ID NO: 33)
Mus musculus	ARNm de la isoforma 1 de TSLP	NM_021367. 2	CACGTTTCAGG CGACAGCATG GTTCTTCTCA GGAGCCTCTT CATCCTGCAA GTACTAGTAC GGATGGGGCT AACTTACAAC TTTTCTAACT GCAACTTCAC GTCAATTACG AAAATATATT GTAACATAAT TTTTCATGAC CTGACTGGAG ATTTGAAAGG GGCTAAGTTC GAGCAAATCG AGGACTGTGA GAGCAAGCCA GCTTGTCTCC TGAAAATCGA GTACTATACT CTCAATCCTA TCCCTGGCTG CCCTTCACTC CCCGACAAAA CATTTGCCCG GAGAACAAGA GAAGCCCTCA ATGACCACTG CCCAGGCTAC CCTGAAACTG AGAGAAATGA CGGTACTCAG GAAATGGCAC AAGAAGTCCA AAACATCTGC CTGAATCAAA CCTCACAAAT TCTAAGATTG TGGTATTCCT TCATGCAATC TCCAGAATAA AATTAGCTTT CAGCTTCTGC TATGAAAATC TCTATCTTGG TTTTAGTGGA CAGAATACTA AGGGTGTGAC ACTTAGAGGA CCACTGGTGT TTATTCTTTA ATTACAGAAG GGATTCTTAA CTTATTTTTT GGCATATCGC TTTTTTCAGT ATAGGTGCTT TAAATGGGAA ATGAGCAATA GACCGTTAAT GGAAATATCT GTACTGTAA TGACCAGCTT CTGAGAAGTC TTTCTCACCT CCCCTGCACA CACCTTACTC TAGGGCAAAC CTAAGTGTAG TAGGAAGAGA ATTGAAAGTA GAAAAAAAAA ATTAAAACCA ATGACAGCAT CTAAACCCTG TTTAAAAGGC AAGGATTTTT CTACCTGTAA TGATTCTTCT AACATTCTTA TGCTAAGATT TTACCAAAGA AGAAAATGAC AGTTCGGGCA GTCAGTGCCA TGATGAGGTG GTCTGAAAGA AGATTGTGGA ATCTGGGAGA AACTGCTGAG ATCATATTGC AAATCCAGCT GTCAAAGGGT TCAGACCCAG GACAGTACAA TTCGTGAGCA GATCTCAAGA GCCTTGCACA TCTACGAGAT ATATATTTAA AGTTGTAGAT AATGAATTTT TAATTTATTT TGTGAGCACT TTTGGAAATA TACATGCTAC TTTGTAATGA ATACATTTCT GAATAAAGTA ATTCTCAAGT TTGAAAAAAAA AAA (SEQ ID NO: 34)
Mus musculus	ARNm de la isoforma 2 de TSLP	NR_033206.1	ACTCTTGCCA GGCACCTCCC TCCTGTGGGT TGATTCCGTT TTCCTCTTCT CAACTGACTC TGGATTCTGA TACCAGACAC CTTCTGGTG TCTTTCCCTC CTATCCCAT CCCCTTCCCT GTCCCTTTCA TTCAATTTTT AATATCTGGC GGGTTTTTTT TTTTTTTTCT CTCTCTCTGA ACTGTGCCGC TTGTGAGCAG CCAGCTTGTC TCCTGAAAAT CGAGTACTAT ACTCTCAATC CTATCCCTGG CTGCCCTTCA CTCCCCGACA AAACATTTGC CCGGAGAACA AGAGAAGCCC TCAATGACCA CTGCCCAGGC TACCCTGAAA

			CTGAGAGAAA TGACGGTACT CAGGAAATGG CACAAGAAGT CCAAAACATC TGCCTGAATC AAACCTCACA AATTCTAAGA TTGTGGTATT CCTTCATGCA ATCTCCAGAA TAAAATTAGC TTTCAGCTTC TGCTATGAAA ATCTCTATCT TGGTTTTAGT GGACAGAATA CTAAGGGTGT GACACTTAGA GGACCACTGG TGTATTATTCT TTAATTACAG AAGGGATTCT TAACTTATTT TTTGGCATAT CGCTTTTTTC AGTATAGGTG CTTTAAATGG GAAATGAGCA ATAGACCGTT AATGGAAATA TCTGTACTGT TAATGACCAG CTTCTGAGAA GTCTTTCTCA CCTCCCCTGC ACACACCTTA CTCTAGGGCA AACCTAACTG TAGTAGGAAG AGAATTGAAA GTAGAAAAAA AAAATTAAAA CCAATGACAG CATCTAAACC CTGTTTAAAA GGCAAGGATT TTTCTACCTG TAATGATTCT TCTAACATTC CTATGCTAAG ATTTTACCAA AGAAGAAAAT GACAGTTCGG GCAGTCACTG CCATGATGAG GTGGTCTGAA AGAAGATTGT GGAATCTGGG AGAAACTGCT GAGATCATAT TGCAAATCCA GCTGTCAAAG GGTTCAGACC CAGGACAGTA CAATTCGTGA GCAGATCTCA AGAGCCTTGC ACATCTACGA GATATATATT TAAAGTTGTA GATAATGAAT TTCTAATTTA TTTTGTGAGC ACTTTTGGAA ATATACATGC TACTTTGTAA TGAATACATT TCTGAATAAA GTAATTCTCA AGTTTGAAAA AAAAAA (SEQ ID NO: 35)
Rattus norvegicus	Aminoácido TSLP.	XP_008770274.1	MVLFRYLFILQVVRLLTYNFSNCNFEMILRIYH ATIFRDLKDLNGLFDQIEDCDSRTACLLKIDHH TFNPVPGCPSLPEKAFALKTKAALINYPGY SETERNGTLEMTREIRNICLNQTSQILGLWLSCI QS (SEQ ID NO: 36)
Rattus norvegicus	ARNm de TSLP	XM_008772052.1	TCAGGCAACA GCATGGTTCT TTTCAGGTAC CTCTTTATCC TGCAAGTGGT ACGGCTGGCA CTAACTTACA ACTTTTCTAA CTGTAACCTC GAGATGATTT TGAGAATATA TCATGCAACA ATTTTTCGTG ACCTGCTTAA AGATTTGAAT GGGATCTTGT TCGACCAAAT CGAGGACTGT GACAGCAGGA CAGCTTGTCT CCTGAAAATC GACCACCATA CCTTCAATCC TGTCCCTGGC TGCCCGTCAC TCCCGAGAA AGCGTTCGCT TTGAAAACGA AAGCGGCCCT CATTAACCTAC TGCCCAAGGCT ACTCTGAAAC TGAGAGAAAT GGTACTCTGG AAATGACACG AGAAATCAGA AACATCTGCC TGAATCAAAC CTCACAAATT CTAGGATTGT GGCTTTCCTG CATTCAATCT TGAAGAAAAA ATTAGCTTTT GGATTATATT ATGAAAATAT ATATCTTGT TTTAGTAGAT ATAATACTAA GGGTGTGACA CTTAAAAGAA CACTAATGTT TATTCTTTAA TTATAGAAGG GATTCTTAAC TTATTTTGG CATATCGTTG

		TTTAGTGTAG GCGCTTTAAA TGGAAAATGA GCATTACCCC TTTAATGGAA ATAACCGTGC TGTTAATGAT TGGCTTCGGC TTCTGAGCAG TCTTTCTCAC CTCACCTGAG ACACCTTACT CTAGGGCAAA CCTAACTGTA GTAGGAAGAA AATCAAAAGT AGAAAAACAG TTGAAACCAA TGACAGGATC TATACTCCAT TTAAGAGGCA AGAATTTTGG TACCTGTAAT GATTCTTCTA ACATTCCTAC GCTAAGATTT TACTAAAGAA GAAAATAACA GCAGAGGAAA GTGTTTCAGGC AGTCACTGCC ATGATGAAGC TGTCAGAATC TGAGAGCTAC TGCTGCAACT GATCGTGTAG TAAATCCAGC TGTAAGGGG ATCTTAACCC ACCACAGTGG GATGCACAGG CAGATCCCCA AGGGCATTGT GCAGCTGTGA GATATATATT TAAAGTTGTA TATAATGATT TTCTAATTTA TTCCGTGAGC ACCTTTGAAA ATATACATGT CGCTGTGTAA CAAATACACT TCTGAATAAA GTAATTCTCA AGTTC (SEQ ID NO: 37)
--	--	--

[0040] La isoforma 1 TSLP más larga, está vinculada con el desarrollo de la enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias (Headley, 2009, Diario de Inmunología 182, 1641-1647;. Ying, 2005, Diario de Inmunología 174, 8.183-8190). El término "TSLP" tal como se utiliza en la presente se refiere a la isoforma 1 de TSLP. Como se utiliza en la presente, la proteína TSLP humana también abarca proteínas que tienen en toda su longitud al menos aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80 %, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de número de acceso GenBank NP_149024.1. Una secuencia de ácido nucleico de TSLP humano tiene en toda su longitud al menos aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% , 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico de número de acceso GenBank NM_033035.4. Las secuencias de proteínas murinas, cyno, y otras proteínas animales TSLP son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la Tabla 1).

[0041] El término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a una proteína o secuencia de polipéptido derivada de una molécula de

inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, de cadena múltiple o sencilla, de inmunoglobulinas intactas, y pueden derivarse de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Un "anticuerpo" de origen natural es una glicoproteína que

5 comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está

10 compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en las regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la

15 complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión

20 que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humano, anticuerpo

25 humanizado, anticuerpo camelizado, o anticuerpo quimérico. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

[0042] Los términos "fragmento de anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno", "fragmento de unión a antígeno del mismo," "porción de unión

30 a antígeno", y similares, tal como se utilizan en la presente, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (ej., TSLP). Las funciones de unión a

antígenos de un anticuerpo pueden realizarse por fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión contemplados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un
5 fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de único dominio (dAb) (Ward, (1989) Nature 341: 544-546), que
10 consiste en un dominio VH; y una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador peptídico artificial que les permite ser hechos como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se parean para
15 formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird, (1988) Science 242:423-426; y Huston, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla incluyen una o más "porciones de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los
20 expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan según la utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y scFv bis-(véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, (2005) Nature Biotechnology
25 23:19, 1126-1136) . Las porciones de unión al antígeno de los anticuerpos pueden ser injertadas en andamios con base en polipéptidos tales como la fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de EE.UU. No. 6.703.199, que describe monocuerpos polipeptídicos de fibronectina). Las porciones de unión al antígeno se pueden incorporar en moléculas de cadena única que comprende
30 un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos complementarios de cadena ligera, forman un par de regiones de

unión al antígeno (Zapata., (1995) Protein Eng. 8:1057-1062; y Patente de EE.UU. No. 5.641.870). No. 5,641,870].

[0043] El término "epítopo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o de otra manera interactuar con una molécula. Determinantes epitópicos consisten generalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o hidratos de carbono o cadenas laterales de azúcares y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítopo puede ser "lineal" o "conformacional." Los epítomos conformacionales y lineales se distinguen en que la unión a los primeros y no a los últimos se pierde en presencia de solventes desnaturizantes.

[0044] La definición del término "paratopo" se deriva de la definición anterior de "epítopo" mediante la inversión de la perspectiva. Por lo tanto, el término "paratopo" tal como se utiliza aquí se refiere a la zona o región en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo en la que un antígeno se une específicamente, es decir, en la que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo hace contacto físico con el antígeno.

[0045] En el contexto de una estructura cristalina derivada de rayos X definida por las coordenadas espaciales de un complejo entre un anticuerpo, ej., un fragmento Fab, y su antígeno, el término paratopo está en el presente documento, salvo que se especifique o dicte lo contrario por el contexto, específicamente se define como residuos del anticuerpo caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo distinto del hidrógeno) dentro de una distancia especificada, por ejemplo una distancia de 4 angstrom, a partir de un átomo pesado en un antígeno diana.

[0046] Los términos "regiones determinantes de complementariedad" y "CDRs" como se utilizan en la presente, se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que son responsables de la unión al antígeno.

[0047] El término "anticuerpo monovalente" tal como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que se une a un único epítopo en una molécula diana.

5 [0048] El término "anticuerpo bivalente" tal como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos en al menos dos moléculas diana idénticas. El anticuerpo bivalente también entrecruza las moléculas diana entre si. Un "anticuerpo bivalente" también se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos diferentes en al menos dos moléculas diana idénticas.

10 [0049] El término "anticuerpo multivalente" se refiere a una única molécula de unión con más de una valencia, donde "valencia" se describe como el número de fracciones de unión a antígeno presentes por molécula de un constructo de anticuerpo. Como tal, la molécula de unión sola se puede unir a más de un sitio de unión en una molécula diana. Ejemplos de anticuerpos multivalentes incluyen, pero no se limitan a anticuerpos bivalentes, anticuerpos trivalentes, 15 anticuerpos tetravalentes, anticuerpos pentavalentes, y similares, así como anticuerpos biespecíficos y anticuerpos biparatópicos. Por ejemplo, para TSLP, un anticuerpo multivalente tal como un anticuerpo biparatopico TSLP tiene una fracción de unión que reconoce dos dominios diferentes de TSLP, respectivamente.

20 [0050] El término "anticuerpo multivalente" también se refiere a una única molécula de unión que tiene más de una fracción de unión al antígeno para dos moléculas diana independientes. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a TSLP y una segunda molécula diana que no es TSLP. En una modalidad, un anticuerpo multivalente es un anticuerpo tetravalente que tiene cuatro dominios 25 de unión de epítopos. Una molécula tetravalente puede ser biespecífica y bivalente para cada sitio de unión en la molécula diana.

[0051] El término "anticuerpo biparatópico" tal como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítopos diferentes en una única molécula diana. El término también incluye un anticuerpo, que se une a 30 dos dominios de al menos dos moléculas diana, ej., un anticuerpo biparatópico tetravalente.

[0052] El término "anticuerpo biespecífico" tal como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que se une a dos o más epítomos diferentes en al menos dos objetivos diferentes.

[0053] Las frases "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utilizan en la presente, se refieren a polipéptidos, incluyendo anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, etc que tienen sustancialmente secuencia de aminoácidos idéntica o se derivan de la misma fuente genética. Este término también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad y afinidad de unión para un epítomo particular.

[0054] El frase "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que ambas las regiones marco y regiones CDR se derivan a partir de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de dichas secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de línea germinal humana, o versiones mutadas de las secuencias de la línea germinal humana o anticuerpos que contienen secuencias variables de consenso derivadas de análisis de secuencias variables humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik, (2000. J Mol Biol 296, 57-86). Las estructuras y ubicaciones de dominios variables de inmunoglobulina, por ejemplo, CDRs, pueden definirse usando esquemas de numeración bien conocidos, por ejemplo, el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia, o una combinación de Kabat y Chothia (véase, por ejemplo, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos EE.UU.(1991), eds Kabat; Lazikani, (1997) J. Mol Bio 273:927-948), Kabat, (1991). Kabat; Al Lazikani, (1997) J. Mol. Bio. 273: 927 948); Kabat, (1991) Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Quinta edición., Publicación NIH No. 91-3242 del Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos; Chothia, (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia, (1989) Nature 342:877-883; y Al-Lazikani, (1997) J. Mal. Biol. 273:927-948.

[0055] Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo, o una sustitución conservativa para promover estabilidad o fabricación). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en este documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertados en secuencias estructurales humanas.

[0056] La frase "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosomal para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, de un transfectoma, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica corte y empalme de la totalidad o una porción de una secuencia de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones variables y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis in vitro (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de anticuerpos de línea germinal humana in vivo.

[0057] El término "región Fc" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende la CH3, CH2 y al menos una porción de la región bisagra de un dominio constante de un anticuerpo. Opcionalmente, una

región Fc puede incluir un dominio CH4, presente en algunas clases de anticuerpos. Una región Fc, puede comprender toda la región de bisagra de un dominio constante de un anticuerpo. En una modalidad, la invención comprende una región Fc y una región CH1 de un anticuerpo. En una modalidad, la invención comprende una región Fc, región CH3 de un anticuerpo. En otra modalidad, la invención comprende una región Fc, una región CH1 y una región Ckappa/lambda a partir del dominio constante de un anticuerpo. En una modalidad, una molécula de unión de la invención comprende una región constante, por ejemplo, una región constante de cadena pesada. En una modalidad, tal región constante se modifica en comparación con una región constante de tipo salvaje. Es decir, los polipéptidos de la invención descritos en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio de región constante de cadena ligera (CL). Modificaciones de ejemplo incluyen adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Tales cambios pueden ser incluidos para optimizar la función efectora, la vida media, etc.

[0058] Como se utiliza en la presente, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos únicos. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del anticuerpo "brazo" interactúa a través de débiles fuerzas no covalentes con el antígeno en numerosos sitios, entre más interacciones, más fuerte es la afinidad. Como se utiliza en la presente, el término "alta afinidad" para un anticuerpo de IgG o fragmento del mismo (ej., un fragmento Fab) se refiere a un anticuerpo que tiene un KD de 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, o 10^{-10} M, o 10^{-11} M o menos, o 10^{-12} M o menos, o 10^{-13} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de alta afinidad puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de alta afinidad para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene un KD de 10^{-7} M o menos, o 10^{-8} M o menos.

[0059] Tal como se utiliza en la presente, el término "avidez" se refiere a una medida informativa de la estabilidad general o la fuerza del complejo anticuerpo-antígeno. Es controlado por tres factores principales: la afinidad del

anticuerpo por el epítopo; la valencia de ambos el antígeno y anticuerpo; y la disposición estructural de las partes que interactúan. En última instancia estos factores definen la especificidad del anticuerpo, es decir, la probabilidad de que el anticuerpo particular se enlace a un epítopo del antígeno preciso.

5 [0060] El término "especificidad de unión", como se usa en la presente se refiere a la capacidad de un sitio de combinación de anticuerpos individuales para reaccionar con un determinante antigénico y no con un determinante antigénico diferente. El sitio de combinación del anticuerpo se encuentra en la porción Fab de la molécula y se construye a partir de las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras. La afinidad de unión de un anticuerpo es la
10 fuerza de la reacción entre un único determinante antigénico y un único sitio de combinación en el anticuerpo. Es la suma de las fuerzas de atracción y repulsión que operan entre el determinante antigénico y el sitio de combinación del anticuerpo.

15 [0061] El término "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar un cambio o trastorno fisiológico indeseado. Para fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, condición estabilizada de la enfermedad (es decir, no empeoramiento), retraso
20 o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

25 [0062] El término "sujeto" se refiere a un animal, humano o no humano, al cual se proporciona tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención. Se contemplan aplicaciones veterinarias y no veterinarias. El término incluye, pero no se limita a, mamíferos, ej., humanos, otros primates, cerdos, roedores tales como ratones y ratas, conejos, cobayas, hámsteres, vacas,
30 caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. Sujetos típicos incluyen humanos, animales de granja, y animales domésticos tales como gatos y perros.

[0063] Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Por ejemplo, una cantidad terapéutica es aquella que logra el efecto terapéutico deseado. Esta cantidad puede ser igual o diferente de una cantidad profilácticamente eficaz, que es una cantidad necesaria para prevenir la aparición de la enfermedad o síntomas de la enfermedad. Una cantidad eficaz puede ser administrada en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto terapéutico (es decir, una dosis efectiva) depende de los compuestos terapéuticos seleccionados. Las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, de una o más veces al día, a una o más veces por semana, a una o más veces por mes, a una o más veces al año. El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente un sujeto, incluyendo pero no limitado a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos terapéuticos descritos en la presente puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos.

[0064] El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere al ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma de hebra sencilla o doble. A menos que específicamente se limite, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y son metabolizados de una manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácidos nucleicos particular abarca también implícitamente variantes modificadas conservativamente de los mismos (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNPs y secuencias complementarias así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, sustituciones de codones degenerados se pueden conseguir por generación de secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzner, (1991) Nucleic

Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[0065] Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente, y se refieren a un compuesto conformado por residuos de aminoácidos unidos covalentemente por enlaces peptídicos. Una proteína o péptido deben contener al menos dos aminoácidos, y ninguna limitación en el número máximo de aminoácidos que puede comprender una secuencia de péptido o de proteína. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en la presente, el término se refiere tanto a cadenas cortas, que comúnmente también se hace referencia en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, que generalmente se hace referencia en la técnica como proteínas, de las cuales hay muchos tipos. Los "polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Un polipéptido incluye un péptido natural, un péptido recombinante, o una combinación de los mismos.

[0066] El término "modificaciones de secuencia conservadoras" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan significativamente o alteran las características de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales

ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de una molécula, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, de la invención pueden ser reemplazados por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y la molécula alterada puede ser probada usando los ensayos funcionales descritos en este documento .

[0067] El término "homólogo" o "identidad" se refiere a la identidad de secuencia de la subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición de subunidad en ambas de las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50% homólogas, si el 90% de las posiciones (por ejemplo, 9 de 10), son coincidentes o homólogas, las dos secuencias son 90% homólogas. El porcentaje de "identidad de secuencia" puede determinarse mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en donde el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (ej., huecos o salientes) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se puede calcular determinando el número de posiciones en las que el residuo de aminoácido idéntico ocurre en ambas secuencias para dar el

número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. La salida es el porcentaje de identidad de secuencia en cuestión con respecto a la secuencia de consulta.

[0068] El término "Aislado" significa alterado o removido de su estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido de forma natural presente en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo ácido nucleico o péptido parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislado". Un ácido nucleico aislado o proteína puede existir en forma sustancialmente purificada o puede existir en un entorno no nativo, tal como, por ejemplo, una célula huésped. Un anticuerpo aislado está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a TSLP está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen a antígenos distintos de TSLP). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a una molécula diana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con los mismos antígenos de otras especies, por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a TSLP humana puede unirse a moléculas TSLP de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

[0069] En algunas modalidades, la formulación en polvo seco de la presente invención comprende partículas de núcleo recubierto que comprenden: un excipiente formador de recubrimiento y un núcleo que comprende el ingrediente activo, excipientes formadores de la matriz y un agente tampón, a veces también se refiere en el presente documento a la formulación de plataforma o a la formulación de plataforma de núcleo recubierto.

[0070] El término "ingrediente activo", "ingrediente terapéuticamente activo", "agente activo", "fármaco" o "sustancia farmacológica" como se usa en este documento se refiere al ingrediente activo de un producto farmacéutico, también conocido como un ingrediente farmacéutico activo (API).

[0071] El término "diámetro medio de masa" o "MMD" o "x50" como se usa en la presente significa el diámetro medio de una pluralidad de partículas, típicamente en una población polidispersa de partículas, es decir, que conciste en un rango de tamaños de partículas. Los valores de MMD reportados en la
5 presente se determinan por difracción láser (Sympatec Helos, Clausthal-Zellerfeld, Alemania), a menos que el contexto indique lo contrario. En contraste, d_g representa el diámetro geométrico para una sola partícula.

[0072] El término "densidades al compactar" o $\square_{compactada}$ tal como se utiliza aquí se refiere a una densidad de partícula medida según el Método I,
10 como se describe, por ejemplo, en www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/m99375-bulk_density_and_tapped_density_of_powders.pdf. Las densidades al compactar representan la aproximación más cercana de la densidad de partículas, con valores medidos que son aproximadamente 20% menores que la
15 densidad de partícula real.

[0073] El término "rugoso" como se usa en la presente significa que tiene numerosas arrugas o pliegues, es decir, que es surcado o arrugado.

[0074] El término "rugosidad" como se usa en la presente es una medida de la rugosidad de superficie de una partícula modificada. Para los fines de esta
20 invención, la rugosidad se calcula a partir del área superficial específica obtenida a partir de mediciones BET, densidad real obtenida a partir de picnometría de helio, y la relación de superficie a volumen obtenida por difracción láser (Sympatec), a saber:

$$Rugosity = (SSA \rho_{true}) / S_v$$

25 donde $S_v = 6/D_{32}$, donde D_{32} es el diámetro promedio basado en el área de superficie unitaria. Se espera que los aumentos en la rugosidad de superficie reduzcan las fuerzas de cohesión entre partículas, y mejoren la orientación del aerosol hacia los pulmones. Se espera que el direccionamiento pulmonar mejorado reduzca la variabilidad entre pacientes, y los niveles de fármaco en la

orofaringe y la circulación sistémica. En una o más modalidades, la rugosidad S_v es de 3 a 20, ej., de 5 a 10.

[0075] El término "diámetro aerodinámico medio de las partículas primarias" o D_a como se utiliza en la presente se calcula a partir del tamaño geométrico primario de las partículas determinado mediante la difracción de láser (x50), y su densidad al compactar, a saber: $D_a = x50 (\rho_{\text{compact}})^{1/2}$.

[0076] El término "dosis emitida" o "DD" tal como se utiliza en la presente, se refiere a una indicación de la entrega de polvo seco desde un dispositivo inhalador después de un accionamiento o evento de dispersión desde una unidad de polvo. DD se define como la relación de la dosis liberada por un dispositivo inhalador a la dosis nominal o medida. La DD es un parámetro determinado experimentalmente, y se puede determinar usando un dispositivo *in vitro* configurado para imitar la dosificación del paciente.

[0077] El término "diámetro aerodinámico medio de masa" o "MMAD" como se usa en el presente documento se refiere al tamaño aerodinámico medio de una pluralidad de partículas, típicamente en una población polidispersa. El "diámetro aerodinámico" es el diámetro de una esfera de densidad unitaria que tiene la misma velocidad de asentamiento, generalmente en aire, como un polvo y por lo tanto es una forma útil para caracterizar una formulación de polvo en aerosol u otra formulación de partícula o formulación dispersa de partículas en términos de su comportamiento de sedimentación. Las distribuciones de tamaño de partícula aerodinámicas (APSD) y MMAD se determinan en la presente mediante el impacto de cascada usando un equipo NEXT GENERATION IMPACTOR™. En general, si las partículas son aerodinámicamente demasiado grandes, menos partículas alcanzarán el pulmón profundo. Si las partículas son demasiado pequeñas, un mayor porcentaje de las partículas puede ser exhalado. En contraste, d_a representa el diámetro aerodinámico para una sola partícula.

[0078] El término "dosis pulmonar total" (TLD) como se utiliza en la presente se refiere al porcentaje de ingrediente activo (s) que no se deposita en un modelo de boca y garganta idealizado Alberta después de la inhalación de

polvo desde un inhalador de polvo seco a una caída de presión de 4 kPa. Los datos pueden expresarse como un porcentaje de la dosis nominal o la dosis emitida. El AIT representa una versión idealizada de las vías respiratorias superiores para un sujeto adulto medio. A menos que se indique lo contrario, TLD se mide en el modelo idealizado de garganta Alberta. La información sobre el AIT y una descripción detallada de la configuración experimental se puede encontrar en: www.copleyscientific.com.

[0079] El término "parámetro de inercia", como se usa en la presente, se refiere al parámetro que caracteriza el impacto inercial en el tracto respiratorio superior. El parámetro se deriva de la ley de Stoke y es igual a $d_a^2 Q$, donde d_a es el diámetro aerodinámico, y Q es la tasa de flujo volumétrico.

[0080] El término "contenido de sólidos" como se utiliza en la presente, se refiere a la concentración de ingrediente(s) activo(s) y los excipientes disueltos o dispersos en la solución o dispersión líquida a ser pulverizados.

[0081] El término "ALR" como se usa en la presente es un parámetro de proceso que define la relación de aire a líquido utilizada en un atomizador. Valores ALR menores normalmente producen gotas atomizadas más grandes.

[0082] El término "densidad de población de partículas" (PPD) como se utiliza en la presente es un número adimensional calculado a partir del producto del contenido de sólidos y la tasa de flujo de líquido atomizador dividido por la tasa de flujo total de gas de secado. La PPD se ha observado que se correlaciona con el tamaño de partícula geométrico primario.

Moléculas de Unión a TSLP

[0083] Se proporcionan en la presente, ej., anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, incluyendo Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, y fragmentos de dAb, scFv, anticuerpos de dominio único, maxibodies, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NARs y bis-SCFvs, que se unen específicamente a TSLP e inhiben la actividad de TSLP. Estas moléculas son útiles para tratar condiciones inflamatorias relacionadas con TSLP, incluyendo asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Puesto que TSLP es una

citoquina nodal clave aguas arriba de las citoquinas efectoras Th2, la inhibición de TSLP puede bloquear simultáneamente múltiples efectores Th2 aguas abajo (ej., IL-4, IL-5, IL-13) y también pueden impactar en las vías no mediadas por Th2 (por ejemplo, IL-17, IFN- γ).

5 **Anticuerpos TSLP y fragmentos de anticuerpos de unión a TSLP**

 [0084] En algunas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a TSLP humana. Los anticuerpos TSLP y fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, los anticuerpos monoclonales humanos y humanizados y
10 fragmentos de anticuerpos generados como se describe en el presente documento, incluso en los Ejemplos. En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 100 pM, por ejemplo, una K_D de menos de 90 pM, inferior a 80 pM,
15 inferior a 70 pM, inferior a 60 pM, inferior a 50 pM, inferior a 40 pM, inferior a 30 pM, inferior a 20 pM, inferior a 10 pM. En algunas modalidades, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno proporcionados en este documento se unen TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 10 pM.

20 [0085] En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP proporcionados en este documento incluyen una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 una cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada, y una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 una cadena ligera y una CDR3 cadena ligera. En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP proporcionadas en la
25 presente incluyen una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3. En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP proporcionadas en este documento incluyen una secuencia de cadena pesada de longitud completa y una secuencia de cadena ligera de longitud completa. En
30 algunas modalidades, la molécula es un Fab de unión a TSLP.

 [0086] La Tabla 2 enumera las secuencias de anticuerpos de unión a TSLP de ejemplo y los Fabs, todos estos se unen a TSLP humano con alta

afinidad. Por ejemplo, Fab1 anti-TSLP se une a TSLP humana recombinante con una constante de disociación (K_D) de 6 pM. En algunas modalidades, Fab1 anti-TSLP une a las proteínas TLSP humanas y de mono cynomolgus con valores K_D de pM 5.0 ± 2.0 y 1.4 ± 0.6 pM, respectivamente.

5 **TABLA 2. Secuencias de aminoácidos de Fabs anti-TSLP y anticuerpos**

mAb1 anti-TSLP		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Combinada)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinada)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinada)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEC ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSDYWMHWVRQAPGKGLEWVGHISKT DAGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCAREIYYAFDSWGQ GTLVTVSS
SEQ ID NO: 8	Cadena Pesada de ADN	GAGGTTCACTGGTGGATCAGGCGGC GGACTGGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTT AGACTTAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCA CCTTTAGCGACTACTGGATGCACTGGGT TAGACAGGCCCCTGGTAAAGGCTTGA GTGGGTCGGACACATTAAGTCTAAGAC CGACGCCGGCACTACCGACTACGCCGC TCCCGTTAAGGGCCGGTTCATCTCT AGGGACGACTCTAAGAACACCCTCTAC CTTCAAATGAATAGCCTTAAGACCGAGG ACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAG AAATCTACTACTACGCCTTCGATAGCTG GGGTCAAGGCACCCTCGTGACCGTGTC TAGC
SEQ ID NO: 9	Cadena Pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSDYWMHWVRQAPGKGLEWVGHISKT DAGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCAREIYYAFDSWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH

		TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEC ID NO: 10	ADN de Cadena Pesada	GAGGTTTCAGCTGGTGAATCAGGCGGC GGAAGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTT AGACTTAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTCA CCTTTAGCGACTACTGGATGCACTGGGT TAGACAGGCCCCTGGTAAAGGCTTGA GTGGGTCGGACACATTAAGTCTAAGAC CGACGCCGGCACTACCGACTACGCCGC TCCCGTTAAGGGCCGGTTCATCTCTCT AGGGACGACTCTAAGAACACCCTCTAC CTTCAAATGAATAGCCTTAAGACCGAGG ACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAG AAATCTACTACTACGCCTTCGATAGCTG GGGTCAAGGCACCCTCGTGACCGTGTC TAGCGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGT GTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTC TACTTCCGGCGGAAGTCTGCCCTGGG TTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGA GCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGG GGCTCTGACTTCCGGCGTGCACACCTT CCCC GCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGT GCCCTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGAC CTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCAC ACCTGCCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTG TTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACC TGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAG GACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGC CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTA CAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGT GCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCT GAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGT CTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAAT CGAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACAC CCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC

		CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCC AGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCC CCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCT TCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA CAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTC CCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Combinada)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Combinada)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Combinada)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEC ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY
SEC ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGS KYVHWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGI PERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYY CQAADWVDFYVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 18	ADN VL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGC GTTAGCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCT AGAATCACCTGTAGCGGCGATAATATCG GCTCTAAATACGTTCACTGGTATCAGCA GAAGCCCGGTCAAGCCCCCGTGCTCGT GATCTACGGCGATAACGAGCGGCCTAG CGGAATCCCCGAGCGGTTTAGCGGCTC TAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGACT ATCTCTAGGGCTCAGGCCGCGACGAG GCCGACTACTACTGTCAGGCCGCCGAC TGGGTGGACTTCTACGTGTTGCGCGGA GGCACTAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 19	Cadena Ligera	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGS KYVHWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGI PERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYY CQAADWVDFYVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTSPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEG STVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 20	ADN de Cadena Ligera	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGC GTTAGCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCT AGAATCACCTGTAGCGGCGATAATATCG GCTCTAAATACGTTCACTGGTATCAGCA

		GAAGCCCGGTCAAGCCCCCGTGCTCGT GATCTACGGCGATAACGAGCGGCCTAG CGGAATCCCCGAGCGGTTTAGCGGCTC TAATAGCGGTAAACACCGCTACCCTGACT ATCTCTAGGGCTCAGGCCGCGACGAG GCCGACTACTACTGTCAGGCCGCCGAC TGGGTGGACTTCTACGTGTTCCGGCGGA GGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTCAA CCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTG TTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAG GCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTG ATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTG ACCGTGCCCTGGAAGGCCGACAGCAGC CCCGTGAAGGCCGGCGTGAGACAC CACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAA GTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCT GACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAG GTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGA GGGCAGCACCGTGGAAGAACCGTGGC CCCAACCGAGTGCAGC
Fab1 anti-TSLP		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Combinada)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinada)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinada)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS
SEC ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSDYWMHWVRQAPGKGLEWVGHIKSKT DAGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCAREIYYAFDSWGQ GTLVTVSS
SEQ ID NO: 21	ADN VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCAGGCGGC GGAAGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTTAGCGACTACTGGATGCACTGG GTCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTG GAGTGGGTGCGACACATTAAGTCTAAG ACCGACGCCGGCACTACCGACTACGCC GCTCCTGTGAAGGGCCGGTTCACTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACCCTGT ACCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGA GGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAG AGAGATCTACTACTACGCCTTCGATAGC

		TGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTG TCTAGC
SEC ID NO: 22	Cadena Pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSDYWMHWVRQAPGKGLEWVGHIKSKT DAGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLKTEDTAVYYCAREIYYAFDSWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 23	ADN de Cadena Pesada	GAGGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGCGGC GGACTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTG AGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTC ACCTTTAGCGACTACTGGATGCACTGG GTCAGACAGGCCCTGGTAAAGGCCTG GAGTGGGTTCGGACACATTAAGTCTAAG ACCGACGCCGGCACTACCGACTACGCC GCTCCTGTGAAGGGCCGGTTCACTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCCTGT ACCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGA GGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAG AGAGATCTACTACTACGCCTTCGATAGC TGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTG TCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCTCC GTGTTCCCTCTGGCCCCCTTCAGCAAGT CTACCTCTGGCGGCACCGCTGCTCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTG AGCCTGTGACAGTGTCTGGAAGTCTG GCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCT TCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCC TGTAATCCCTGTCCTCCGTGGTGACAGT GCCTTCCCTCCAGCCTGGGCACCCAGAC CTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCT TCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTG GAGCCTAAGTCATGC
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Combinada)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Combinada)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Combinada)	QAADWVDFYV
SEC ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEC ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY
SEQ ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGS KYVHWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGI

		PERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYY CQAADWVDFYVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 24	ADN VL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGC GTCAGCGTGGCCCTGGGTCAGACCGCT AGAATCACCTGTAGCGGCGATAATATCG GCTCTAAATACGTGCACTGGTATCAGCA GAAGCCCGGTCAGGCCCCCGTGCTGGT GATCTACGGCGATAACGAGCGGCCTAG CGGAATCCCCGAGCGGTTTAGCGGCTC TAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGACT ATCTCTAGGGCTCAGGCCGCGACGAG GCCGACTACTACTGTCAGGCCGCGGAC TGGGTGGACTTCTACGTGTTCTGGCGGA GGCACTAAGCTGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 25	Cadena Ligera	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGS KYVHWYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGI PERFSGSNSGNTATLTISRAQAGDEADYY CQAADWVDFYVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEG STVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 26	ADN de Cadena Ligera	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGC GTCAGCGTGGCCCTGGGTCAGACCGCT AGAATCACCTGTAGCGGCGATAATATCG GCTCTAAATACGTGCACTGGTATCAGCA GAAGCCCGGTCAGGCCCCCGTGCTGGT GATCTACGGCGATAACGAGCGGCCTAG CGGAATCCCCGAGCGGTTTAGCGGCTC TAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGACT ATCTCTAGGGCTCAGGCCGCGACGAG GCCGACTACTACTGTCAGGCCGCGGAC TGGGTGGACTTCTACGTGTTCTGGCGGA GGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTCAG CCTAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTG TTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTGCAG GCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTG ATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTG ACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGC CCCGTGAAGGCCGGCGTGAGACCAC CACCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAA GTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCT GACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAG GTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCACGA GGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGC CCCAACCGAGTGCAGC

[0087] En algunas modalidades, los anticuerpos que comprenden una

CDR VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR VH listadas en la Tabla 2. En particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína TSLP, dichos anticuerpos que comprenden (o alternativamente, que constan de) una, dos, tres, cuatro, cinco, 5 o seis CDRs VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VH listadas en la Tabla 2. La presente invención también proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína TSLP, dichos anticuerpos que comprenden una CDR VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDRs VL listadas en la Tabla 2. En 10 particular, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a una proteína TSLP, dichos anticuerpos que comprenden (o alternativamente, que constan de) una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDRs VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDRs VL listadas en la Tabla 2.

[0088] La invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de 15 unión a antígeno de los mismos que comprende (o alternativamente, que consiste en) una secuencia de aminoácidos VH enumerados en la Tabla 2, en el que no más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 aminoácidos de una secuencia de marco (por ejemplo, una secuencia que no es una CDR) se han mutado (en donde una mutación es como 20 varios ejemplos no limitativos, una adición, sustitución o supresión).

[0089] La invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a TSLP, dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos que comprenden (o alternativamente, que consiste en) una secuencia de aminoácidos VL 25 enumerados en la Tabla 2, en donde no más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 aminoácidos de una secuencia de marco (por ejemplo, una secuencia que no es una CDR) se han mutado (en donde una mutación es, como varios ejemplos no limitativos, una adición, sustitución o supresión).

30 [0090] Otros anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención incluyen aminoácidos que han sido mutados, pero tienen al menos 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de identidad

en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla 2 y son capaces de unirse a TSLP. En un aspecto, otros anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones CDR, en comparación con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la Tabla 2.

[0091] La presente invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican VH, VL, la cadena pesada de longitud completa, y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a la proteína TSLP. Tales secuencias de ácidos nucleicos pueden ser optimizados para la expresión en células mamíferas.

[0092] Otros anticuerpos TSLP y fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen aquellos en donde los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos se han mutado, sin embargo, tienen al menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 2. En una modalidad, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen secuencias de aminoácidos mutantes en donde no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos han sido mutados en las regiones variables cuando se comparan con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla 2, mientras conservan sustancialmente la misma actividad terapéutica.

[0093] Puesto que cada uno de estos anticuerpos divulgados en la presente pueden unirse a TSLP, la VH, VL, cadena ligera de longitud completa, y las secuencias de cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) pueden "mezclarse y combinarse" para crear otros anticuerpos de unión a TSLP y fragmentos de unión a antígeno de la invención. Tales anticuerpos de unión a TSLP "mezclados y combinados" pueden ser probados utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica (ej., ELISAs, y otros ensayos descritos en la sección de Ejemplos). Cuando estas cadenas se mezclan y se combinan, una secuencia VH a partir de un pareo VH/VL particular debe ser reemplazada por una secuencia VH estructuralmente similar. Del

mismo modo una secuencia de cadena pesada de longitud completa a partir de un pareo de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe ser reemplazada por una secuencia de cadena pesada de longitud completa de estructura similar. Del mismo modo, una secuencia VL a partir de un pareo VH/VL particular debe ser reemplazada por una secuencia VL estructuralmente similar. Del mismo modo una secuencia de cadena ligera de longitud completa desde un pareo particular de cadena pesada de longitud completa /cadena ligera de longitud completa debe ser reemplazada por una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar.

10 [0094] En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos de unión a TSLP que comprenden las CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena ligera como se describe en la Tabla 2, o combinaciones de los mismos. Las regiones CDR están delineadas mediante el sistema de Kabat (Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Publicación NIH No 91-3242) o utilizando el sistema Chothia (Chothia, 1987 J. Mol. Biol. 196: 901-917; y Al-Lazikani, 1997 J. Mol. Biol. 273: 927-948). Otros métodos para delinear las regiones CDR pueden ser utilizados alternativamente. Por ejemplo, las definiciones CDR de Kabat y Chothia se pueden combinar.

20 [0095] Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a TSLP y que la especificidad de unión a antígenos es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias VH CDR1, 2 y 3 y las secuencias VL CDR1, 2 y 3 pueden "mezclarse y combinarse" (es decir, las CDRs de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y combinarse, aunque cada anticuerpo debe 25 contener una VH CDR1, 2 y 3 para crear otras moléculas de unión a TSLP de la invención. Tales anticuerpos de unión a TSLP "mezclados y combinados " pueden ser probados utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica y aquellos descritos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISAs). Cuando las secuencias CDR VH se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia VH particular debe reemplazarse por una o varias secuencias 30 CDR estructuralmente similares. Del mismo modo, cuando las secuencias CDR VL se combinan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia

VL particular debe reemplazarse por una o varias secuencias CDR estructuralmente similares. Será evidente para el experto que las secuencias VH y VL novedosas pueden crearse al mutar una o más secuencias de regiones CDR VH y/o VL por secuencias estructuralmente similares a partir de las
5 secuencias CDR mostradas en la presente para anticuerpos monoclonales de la presente invención.

[0096] En consecuencia, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en
10 las SEQ ID NO: 1, 4, o 5; una región variable de cadena pesada CDR2 (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID No: 2, o 6; una región variable de cadena pesada CDR3 (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID No: 3; una región variable de cadena ligera CDR1 (LCDR1) que comprende una
15 secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NO: 11 o 14; una región variable de cadena ligera CDR2 (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de SEC ID NO: 12 o 15; una región variable de cadena ligera CDR3 (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de SEC ID NO: 13 o
20 16; en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a TSLP.

[0097] En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TSLP es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo descrito en la Tabla 2.

25 [0098] En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a TSLP humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 4, 2 y 3, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de SEQ ID NOs: 11, 12, y 13, respectivamente;

30 [0099] En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a TSLP humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ

ID NOs: 5, 6 y 3, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de SEQ ID NOs: 14, 15, y 16, respectivamente;

[00100] En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a
5 TSLP humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2, y LCDR3 de SEQ ID NOs: 11, 12, y 13, respectivamente;

[00101] En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a
10 TSLP humana y comprende un VH que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 17.

[00102] En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a
15 TSLP humana y comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 25.

[00103] En algunas modalidades, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a
20 TSLP humana y comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 19.

[00104] Como se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o cadenas pesadas o
25 ligeras de longitud completa que son "el producto de" o "se derivan a partir de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables o cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza los genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina
30 humanos con el antígeno de interés o la selección de una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana presentados en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva a partir de" una

secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede ser identificado como tal mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de
5 línea germinal humana que está más cerca en secuencia (es decir, mayor % de identidad) con la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo,
10 mutaciones somáticas de origen natural o la introducción intencional de mutaciones sitio-dirigidas. Sin embargo, en las regiones variables VH o VL, un anticuerpo humano seleccionado normalmente es al menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de
15 aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En algunos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95%, o aún al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en la
20 secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano recombinante mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos desde la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana en las regiones variables VH o VL. En ciertos casos, el
25 anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencias de aminoácidos desde la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Anticuerpos Homólogos

[00105] En aún ora modalidad, la presente invención proporciona
30 un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias descritas en la Tabla 2, y dicho anticuerpo se une a TSLP y retiene las propiedades funcionales

deseadas de los anticuerpos descritos en la Tabla 2.

[00106] Por ejemplo, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado (o un fragmento de unión al antígeno del mismo) que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de
5 cadena ligera (VL), en donde VH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos 90% , o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7; la VL comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, al menos
10 95%, o al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 17; el anticuerpo se une específicamente a la proteína TSLP e inhibe TSLP.

[00107] En una modalidad, las secuencias de aminoácidos VL y/o VH pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias expuestas en la Tabla 2. En una modalidad, las
15 secuencias de aminoácidos VH y/o VL pueden ser idénticas excepto una sustitución de aminoácidos en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que tiene alta identidad (es decir., 80% o más) con las regiones VH y VL de aquellas descritas en la Tabla 2 puede obtenerse mediante mutagénesis (ej., mutagenesis dirigida a sitio o mediada por
20 PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NO: 8 o 21, o SEQ ID NO: 18, o 24, respectivamente, seguido de pruebas del anticuerpo alterado codificado para la función retenida utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

[00108] En una modalidad, las secuencias de aminoácidos de
25 cadena pesada de longitud completa y/o de cadena ligera de longitud completa pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias divulgadas en la Tabla 2. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa (es decir, 80% o más) a la cadena pesada de longitud completa de SEQ ID NO: 9; y una
30 cadena ligera de longitud completa de SEC ID NO: 19, pueden obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican tales polipéptidos respectivamente,

seguido de la prueba del anticuerpo alterado codificado para la función retenida utilizando ensayos funcionales descritos en el presente documento.

5 [00109] En una modalidad, las secuencias nucleotídicas de cadena pesada de longitud completa y/o de cadena ligera de longitud completa pueden ser al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias divulgadas en la Tabla 2.

10 [00110] En una modalidad, las regiones variables de secuencias nucleotídicas de cadena pesada y/o de cadena ligera pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias divulgadas en la Tabla 2.

15 [00111] Como se usa en la presente, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de identidad es igual al número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha, que es necesario introducir para alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

20 [00112] Adicional o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención se puede utilizar como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra las bases de datos públicos para, por ejemplo, identificar las secuencias relacionadas. Por ejemplo, tales búsquedas se pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2,0) de Altschul. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10.

Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

30 [00113] En algunas modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención tiene una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR tienen secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos descritos en la presente

o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos de unión a TSLP y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o un
5 fragmento de unión al antígeno, que consiste en una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NO: 1,
10 4, o 5; o variantes conservadoras de las mismas; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NO: 2, o 6; o variantes conservadoras de las mismas; una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 3; o variantes conservadoras de las
15 mismas; una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NO: 11 o 14; o variantes conservadoras de las mismas; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las SEC ID NO: 12 o 15; o variantes conservadoras de las mismas;
20 y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de SEC ID NO: 13 o 16, o variantes conservadoras de las mismas; el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a TSLP e inhibe TSLP.

[00114] En algunas modalidades, un anticuerpo o su fragmento de
25 unión al antígeno de la invención tiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que las regiones variables de cadena pesada y ligera han especificado las secuencias de aminoácidos sobre la base de los anticuerpos descritos en este documento o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales
30 deseadas de los anticuerpos de unión a TSLP-y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento de unión al antígeno del mismo,

que conciste en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o variantes conservadoras de la misma; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, o variantes conservativas de la misma; el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se unen específicamente a TSLP e inhibe TSLP.

Anticuerpos que se unen al mismo epítopo

[00115] La presente invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítopo que los anticuerpos de unión a TSLP o fragmentos de anticuerpos listados en la Tabla 2. Por lo tanto, anticuerpos adicionales pueden ser identificados en base a su capacidad para competir de manera cruzada (por ejemplo, inhibir competitivamente la unión de, de una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención en ensayos de unión a TSLP. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención a la proteína TSLP demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo por la unión a TSLP; tal anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo epítopo o un epítopo relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente próximo) en TSLP como el anticuerpo con el que compete. En algunas modalidades, el anticuerpo que se une al mismo epítopo en TSLP que los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos en este documento es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en la presente. En algunas modalidades, el anticuerpo que se une al mismo epítopo en TSLP que los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos en este documento es un anticuerpo monoclonal de ratón. En ciertas modalidades, el anticuerpo que se une al mismo epítopo en TSLP que los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en este documento es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de los anticuerpos monoclonales de ratón. En una cierta modalidad, el anticuerpo

que se une al mismo epítopo en TSLP que los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos en este documento es un anticuerpo monoclonal humanizado. Tales anticuerpos monoclonales humanizados pueden prepararse y aislarse como se describe en la presente.

5 [00116] En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítopo en TSLP humana, en donde el epítopo comprende uno o más de los siguientes residuos: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Lys101, 10 Gln145, y Arg149 de la SEC ID NO: 38. En algunas modalidades, se proporcionan en la presente un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítopo en TSLP humana, en donde el epítopo comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al 15 menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece, al menos catorce, al menos quince, o la totalidad de los siguientes residuos: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Lys101, Gln145, y Arg149 de la SEC ID NO: 38.

 [00117] En algunas modalidades, se proporcionan en la presente un 20 anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítopo en TSLP humana, en donde el epítopo comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, o la totalidad de los siguientes residuos: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, y 25 Thr53 de la SEC ID NO: 38. El epítopo de tal anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir también uno o más de los siguientes residuos: Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Lys101, Gln145, y Arg149 de la SEC ID NO: 38.

 [00118] En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal 30 proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítopo en TSLP humana, en donde el epítopo comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, o la totalidad de

los siguientes residuos: Ser56, Gly57, Thr58, y Lys59 de la SEQ ID NO: 38. El epítipo de tal anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir también uno o más de los siguientes residuos: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Lys101, Gln145, y Arg149 de la SEC ID NO: 38.

5 [00119] En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítipo en TSLP humana, en donde el epítipo comprende Lys101 de la SEQ IDNO: 38. El epítipo de tal anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir también uno o más de los siguientes residuos: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, Gln145, y Arg149 de la SEC ID NO: 38.

10 [00120] En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítipo en TSLP humana, en donde el epítipo comprende Gln 145 o Arg 149 de la SEQ IDNO: 38. En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítipo en TSLP humana, en donde el epítipo comprende Gln 145 y Arg 149 de la SEQ IDNO: 38. El epítipo de tal anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo puede incluir también uno o más de los siguientes residuos: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56, Gly57, Thr58, Lys59, y Lys101 de la SEQ ID NO: 38.

15 [00121] En algunas modalidades, se proporcionan en la presente un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítipo en TSLP humana, en donde el epítipo comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, o la totalidad de los siguientes residuos: Lys49, Ile52, Gly57, Lys59, Lys101, Gln145, y Arg149 de la SEQ ID NO: 38. En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se

20

25

30

une a un epítopo en TSLP humana, en donde el epítopo comprende la totalidad de los siguientes residuos: Lys49, Ile52, Gly57, Lys59, Lys101, Gln145, y Arg149 de la SEQ ID NO: 38.

[00122] En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal
5 proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítopo en TSLP humana, en donde el epítopo comprende al menos uno de los siguientes grupos de residuos: de la SEQ ID NO: 38: (a) Lys49 y Ile52, (b) Gly57 y Lys59, (c) Lys101, (d) Gln145 y Arg149. En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal proporcionado en
10 el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítopo en TSLP humana, en donde el epítopo comprende Lys49 y Ile52 de la SEQ IDNO: 38. En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítopo en TSLP
15 humana, en donde el epítopo comprende Gly57 y Lys59 de la SEQ ID NO: 38. En algunas modalidades, un anticuerpo monoclonal proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítopo en TSLP humana, en donde el epítopo comprende Lys101 de la SEQ IDNO: 38. En algunas modalidades, un anticuerpo
20 monoclonal proporcionado en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, específicamente se une a un epítopo en TSLP humana, en donde el epítopo comprende Gln 145 y Arg 149 de la SEQ IDNO: 38.

[00123] En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP pueden comprender un paratopo que comprende al menos uno, al menos dos,
25 al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, o la totalidad de los siguientes residuos: Thr28, Asp31, Tyr32, Trp33, Asp56, Glu101, Ile102, Tyr103, Tyr104, Tyr105 de una secuencia de cadena
30 pesada de la SEQ ID NO: 22 o Gly28, Ser29, Lys30, Tyr31, Tyr48, Asp50, Asn51, Glu52, Asn65, y Trp92 de una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 25.

[00124] Una vez que se determina un epítopo deseado en un

antígeno, es posible generar anticuerpos a ese epítipo, por ejemplo, utilizando las técnicas descritas en la presente invención. Alternativamente, durante el proceso de descubrimiento, la generación y caracterización de anticuerpos puede dilucidar información acerca de epítipos deseables. A partir de esta
5 información, entonces es posible seleccionar competitivamente anticuerpos para la unión al mismo epítipo. Un enfoque para lograr esto es llevar a cabo estudios de competencia cruzada para encontrar anticuerpos que se unan competitivamente entre sí, por ejemplo, los anticuerpos compiten por la unión al antígeno. Un proceso de alto rendimiento para anticuerpos "binning" en base a
10 su competencia cruzada se describe en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 2003/48731. Como se apreciará por un experto en la técnica, prácticamente cualquier cosa a la que un anticuerpo puede unirse específicamente podría ser un epítipo. Un epítipo puede comprender aquellos residuos a los que el anticuerpo se une.

15 [00125] Generalmente, los anticuerpos específicos para un antígeno diana particular preferentemente reconocerán un epítipo en el antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

[00126] Las regiones de un polipéptido dado que incluyen un epítipo pueden identificarse usando cualquier número de técnicas de mapeo de
20 epítipos, bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítipes lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a
25 porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.708.871; Geysen., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. Natl. Acad. Sci. Immunol. 23:709-715. Del mismo modo, los epítipos
30 conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial como por ejemplo de los aminoácidos TSLP tales como por ejemplo, intercambio de hidrógeno/deuterio, la cristalografía de rayos X y resonancia

magnética nuclear bidimensional Véase, por ejemplo, Protocolos de Mapeo de Epítomos, supra. Regiones antigénicas de las proteínas también se pueden identificar usando antigenicidad estándar y diagramas de hidropatía, tales como los calculados usando, por ejemplo, el programa de software Omiga versión 1.0 disponible en Oxford Molecular Group. Este programa informático emplea el método de Hopp/Woods, Hopp., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78:3824-3828; para determinar los perfiles de antigenicidad, y la técnica de Kyte-Doolittle, Kyte, (1982) J.Mol. Biol. 157:105-132; para diagramas de hidropatía.

Anticuerpos diseñados y modificados

10 [00127] Un anticuerpo de la invención también se puede preparar usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y/o VL como material de partida para diseñar un anticuerpo modificado, el cual puede tener propiedades modificadas con respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede diseñarse mediante la modificación de uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, VH y/o VL), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones variables. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse mediante la modificación de los residuos dentro de la(s) región(es) constante(s), por ejemplo para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

20 [00128] Un tipo de modificación de región variable que puede realizarse es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadenas pesadas y ligeras. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDRs. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos de origen natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR a partir del anticuerpo específico de origen natural injertado en secuencias variables de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann, L., 1998 Nature 332:323-327; Jones, P., 1986 Nature

321:522-525; Queen, C., 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033; U.S. Pat. No. 5,225,539 to Winter, y U.S. Pat. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 to Queen.)

[00129] Tales secuencias variables pueden obtenerse a partir de
5 bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos germinales o secuencias de anticuerpo reordenados. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes humanos de región variable de cadena pesada y ligera pueden encontrarse en la base de datos de secuencias germinales humanas "VBase" (disponible en el
10 sitio web mrc- cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., et al., 1991 Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836; los contenidos de cada una de las cuales se
15 incorporan expresamente en este documento como referencia. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes humanos de región variable de cadena pesada y ligera y secuencias de anticuerpos reordenadas pueden encontrarse en la base de datos "IMGT" (disponible en Internet en www.imgt.org; véase Lefranc, MP et al, 1999 Nucleic Acids. Res. 27: 209-212; el contenido de
20 cada una de las cuales se incorporan expresamente en este documento como referencia).

[00130] Un ejemplo de secuencias variables para su uso en los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismo de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias variables utilizadas
25 por los anticuerpos seleccionados y fragmentos de unión al antígeno de los mismo de la invención, por ejemplo, secuencias de consenso y/o secuencias variables utilizadas por los anticuerpos monoclonales de la invención. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 VH, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 VL, pueden injertarse en regiones variables que tienen la secuencia idéntica a la encontrada
30 en el gen de inmunoglobulina de línea germinal de donde se deriva la secuencia variable, o las secuencias de CDR pueden injertarse en regiones variables que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de línea

germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos, es beneficioso mutar los residuos dentro de las regiones variables para mantener o mejorar la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, Patentes de EE.UU. Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al).

5 [00131] Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de VH y/o VL para mejorar con ello una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés, conocidas como "maduración de afinidad". Mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis mediada por PCR se puede realizar
10 para introducir la(s) mutación(es) y el efecto sobre la unión de anticuerpos, u otra propiedad funcional de interés, pueden evaluarse en ensayos in vitro o in vivo como se describe en la presente y se proporciona en los Ejemplos. Modificaciones conservativas (como se discutió anteriormente) se pueden introducir. Las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos, adiciones
15 o supresiones. Además, típicamente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR se alteran.

 [00132] Una amplia variedad de marcos o andamios de anticuerpos/inmunoglobulina se pueden emplear, siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión que se una específicamente a
20 Epo. Tales marcos o estructuras incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, fragmentos de unión a antígeno del mismo, e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferentemente que tengan aspectos humanizados. Anticuerpos únicos de cadena pesada tales como los identificados en los camélidos son de interés particular en este aspecto.
25 Nuevas estructuras, andamiajes y fragmentos siguen descubriéndose y desarrollándose por los expertos en la técnica.

 [00133] En un aspecto, la invención se refiere a un método de generación de anticuerpos no basados en inmunoglobulinas utilizando andamios no inmunoglobulinos en los que las CDRs de la invención pueden injertarse.
30 Estructuras y andamiajes no inmunoglobulinos conocidos o futuros se pueden emplear, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína Epo diana. Marcos o andamios no inmunoglobulinos conocidos

incluyen, pero no están limitados a, fibronectina (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, Mass.), ankyrin (Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland), domain antibodies (Domantis, Ltd., Cambridge, UK, and Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium), lipocalin (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), small modular
5 immuno-pharmaceuticals (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, Wash.), maxybodies (Avidia, Inc., Mountain View, Calif.), Protein A (Affibody AG, Sweden), y affilin (gamma-crystallin or ubiquitin) (Scil Proteins GmbH, Halle, Germany).

[00134] Los andamiajes de fibronectina se basan en el dominio tipo
10 III de fibronectina (por ejemplo, el décimo módulo de fibronectina tipo III (dominio 10 Fn3)). El dominio de fibronectina tipo III tiene 7 u 8 hebras beta las cuales están distribuidas entre dos láminas beta, que se empaquetan entre sí para formar el núcleo de la proteína, y otras que contienen bucles (análogos a CDRs) que conectan las hebras beta entre sí y están expuestos a solventes. Existen por
15 lo menos tres bucles en cada borde del sándwich de lámina beta, donde el borde es la frontera de la proteína perpendicular a la dirección de las hebras beta (véase Patente EE. UU. No. 6.818.418). Estos andamios basados en fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el pliegue global está estrechamente relacionado con el del fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región
20 variable de la cadena pesada, que comprende la unidad de reconocimiento del antígeno completo en IgG de camello y llama. Debido a esta estructura, el anticuerpo no inmunoglobulina imita las propiedades de unión a antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos andamios se pueden utilizar en una aleatorización de bucle y estrategia de shuffling in vitro
25 que es similar al proceso de maduración de afinidad de anticuerpos in vivo. Estas moléculas basadas en fibronectina pueden usarse como andamios en donde las regiones del bucle de la molécula pueden ser reemplazadas con CDRs de la invención usando técnicas de clonación estándar.

[00135] La tecnología anquirina se basa en el uso de proteínas con
30 módulos de repetición derivados de anquirina como andamios para soportar regiones variables que se pueden utilizar para la unión a diferentes dianas. El módulo de repetición de anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que

conciste en dos hélices alfa antiparalelas y un giro beta. La unión de las regiones variables está optimizada principalmente mediante el uso de representación de ribosomas.

[00136] Avimeros son derivados de proteína que contiene dominio A natural tal como LRP-1. Estos dominios se utilizan por naturaleza para interacciones proteína-proteína y en los humanos más de 250 proteínas están estructuralmente basadas en dominios-A. Los avimeros constan de un número de diferentes monómeros de “dominio-A” (2-10) ligados a través de enlazadores de aminoácidos. Pueden crearse avimeros que pueden unirse al antígeno diana utilizando la metodología descrita en, por ejemplo, Publicación de Solicitud de Patente EE UU Nos. 20040175756; 20050053973; 20050048512; y 20060008844

[00137] Los ligandos de afinidad de anticuerpos son pequeñas proteínas simples compuestas de un conjunto de tres propéptidos basado en el andamiaje de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A. La proteína A es una proteína de superficie de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio andamiaje conciste en 58 aminoácidos, 13 de los cuales son asignados al azar para generar bibliotecas de anticuerpos con un gran número de variantes de ligandos (Véase, por ejemplo, la Patente EE.UU. 5.831.012). Las moléculas de anticuerpo imitan anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de moléculas de anticuerpo es similar a la de un anticuerpo.

[00138] Las anticalinas son productos desarrollados por la empresa Pieris ProteoLab AG. Son derivados de lipocalinas, un amplio grupo de proteínas pequeñas y robustas que están normalmente implicadas en el transporte o el almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales ocurren en los tejidos humanos o líquidos corporales. La arquitectura de la proteína es una reminiscencia de inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de un marco rígido. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas se componen de una única cadena polipeptídica con 160 a 180 residuos de

aminoácidos, siendo sólo ligeramente más grande que un único dominio de inmunoglobulina. El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra la plasticidad estructural pronunciada y tolera una variedad de cadenas laterales. El sitio de unión puede así reconfigurarse en un proceso patentado con el fin de reconocer las moléculas diana prescritas de forma diferente con alta afinidad y especificidad. Una proteína de la familia lipocalina, la proteína de unión a Bilin (BBP) de *Pieris Brassicae* ha sido utilizada para desarrollar anticualinas por mutagénesis de la serie de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe anticualinas está en la publicación PCT No WO 199916873.

10 [00139] Las moléculas de afilina son pequeñas proteínas no inmunoglobulina que están diseñadas para afinidades específicas hacia las proteínas y moléculas pequeñas. Nuevas moléculas de afilina pueden seleccionarse muy rápidamente a partir de dos bibliotecas, cada una de las cuales está basada en una proteína de andamiaje derivada de ser humano diferente. Las moléculas de afilina no muestran ninguna homología estructural con proteínas de inmunoglobulina. En la actualidad, dos andamios de afilina se emplean, uno de los cuales es cristalino gamma, una proteína del cristalino estructural humano y el otro son las proteínas de la superfamilia "ubiquitina". Ambos andamios humanos son muy pequeños, muestran una estabilidad a alta temperatura y son casi resistentes a los cambios de pH y agentes desnaturizantes. Esta alta estabilidad es principalmente debida a la estructura de lámina beta expandida de las proteínas. Ejemplos de proteínas derivadas de cristalinas gamma se describen en WO200104144 y ejemplos de proteínas tipo "ubiquitina" se describen en WO2004106368.

25 [00140] Miméticos de epítipo proteicos (PEM) son moléculas cíclicas tipo péptido de tamaño medio (MW 1-2 kDa) que imitan las estructuras beta-horquilla secundarias de las proteínas, la estructura secundaria importante implicada en interacciones proteína-proteína.

30 [00141] Los anticuerpos humanos de unión a TSLP pueden generarse usando métodos que son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la tecnología de humanización utilizada para la conversión de anticuerpos no humanos en anticuerpos humanos modificados. La Publicación de Patente

EE:UU. Nº 20050008625 describe un método in vivo para la sustitución de una región variable de anticuerpo no humano por una región variable humana en un anticuerpo manteniendo las mismas o proporcionando mejores características de unión con respecto a las del anticuerpo no humano. El método se basa en la

5 sustitución guiada de epítopo de regiones variables de un anticuerpo de referencia no humano con un anticuerpo completamente humano. El anticuerpo humano resultante es generalmente no relacionado estructuralmente con el anticuerpo no humano de referencia, pero se une al mismo epítopo en el mismo antígeno que el anticuerpo de referencia. En breve, el criterio de sustitución de

10 complementariedad guiado por epítopos serial está habilitado mediante el establecimiento de una competencia en las células entre un "competidor" y una biblioteca de diversos híbridos del anticuerpo de referencia ("anticuerpos de prueba") para la unión de cantidades limitadas de antígeno en presencia de un sistema indicador que responde a la unión del anticuerpo de prueba al antígeno.

15 El competidor puede ser el anticuerpo de referencia o un derivado del mismo tal como un fragmento Fv de cadena sencilla. El competidor puede ser también un ligando natural o artificial del antígeno que se une al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia. Los únicos requisitos del competidor son que se une al mismo epítopo que el anticuerpo de referencia, y que compite con el anticuerpo

20 de referencia para la unión al antígeno. Los anticuerpos de prueba tienen una unión a antígeno de la región V en común a partir del anticuerpo no humano de referencia, y el otro de la región V seleccionada al azar a partir de una fuente diversa tal como una biblioteca repertorio de anticuerpos humanos. La región V común desde el anticuerpo de referencia sirve como una guía, posicionando los

25 anticuerpos de prueba en el mismo epítopo en el antígeno, y en la misma orientación, de modo que la selección es sesgada hacia la fidelidad de unión a antígeno más alta al anticuerpo de referencia.

[00142] Muchos tipos de sistemas indicadores se pueden utilizar para detectar las interacciones deseadas entre anticuerpos de prueba y el

30 antígeno. Por ejemplo, los fragmentos reporteros complementarios pueden estar vinculados a antígeno y anticuerpo de prueba, respectivamente, de modo que la activación de informador mediante complementación de fragmento sólo se

produce cuando el anticuerpo de prueba se une al antígeno. Cuando las fusiones de anticuerpo de prueba- y antígeno-fragmento informador se co-expresan con un competidor, la activación de informador se vuelve dependiente de la capacidad del anticuerpo de ensayo para competir con el competidor, que es
5 proporcional a la afinidad del anticuerpo de prueba para el antígeno. Otros sistemas reporteros que pueden ser usados incluyen el reactivador de un sistema de reactivación de informador auto-inhibido (RAIR) como se describe en la Solicitud de Patente EE.UU. Ser. No. 10/208, 730 (Publicación No. 20030198971), o sistema de activación competitiva descrito en la solicitud de
10 patente de EE.UU. Ser. No. 10/076, 845 (publicación No. 20030157579).

[00143] Con el sistema de sustitución de complementariedad guiada por epítipo serial, se realiza selección para identificar que las células expresan un anticuerpo de prueba único junto con el competidor, el antígeno y los componentes informadores. En estas células, cada anticuerpo de prueba
15 compite uno-a-uno con el competidor para unirse a una cantidad limitante de antígeno. La actividad del informador es proporcional a la cantidad de antígeno unido al anticuerpo de prueba, que a su vez es proporcional a la afinidad del anticuerpo de prueba para el antígeno y la estabilidad del anticuerpo de ensayo. Anticuerpos de prueba se seleccionan inicialmente en base de su actividad
20 relativa a la del anticuerpo de referencia cuando se expresa como el anticuerpo de prueba. El resultado de la primera ronda de selección es un conjunto de anticuerpos "híbridos", cada uno de los cuales está compuesto de la misma región V no humana del anticuerpo de referencia y una región V humana de la biblioteca, y cada uno de los cuales se une al mismo epítipo en el antígeno como
25 el anticuerpo de referencia. Uno o más de los anticuerpos híbridos seleccionados en la primera ronda tendrá una afinidad por el antígeno comparable o superior a la del anticuerpo de referencia.

[00144] En el segundo paso de sustitución de región V, las regiones V humanas seleccionadas en la primera etapa se utilizan como guía para la
30 selección de sustituciones humanas para el restante anticuerpo no humano de referencia de la región V con una biblioteca diversa de regiones V humanas cognadas. Los anticuerpos híbridos seleccionados en la primera ronda también

se pueden usar como competidores para la segunda ronda de selección. El resultado de la segunda ronda de selección es un conjunto de anticuerpos completamente humanos que difieren estructuralmente del anticuerpo de referencia, pero que compiten con el anticuerpo de referencia para la unión al mismo antígeno. Algunos de los anticuerpos humanos seleccionados se unen al mismo epítipo en el mismo antígeno como el anticuerpo de referencia. Entre estos anticuerpos humanos seleccionados, uno o más se une al mismo epítipo con una afinidad que es comparable o superior a la del anticuerpo de referencia.

Anticuerpos Camélidos

- 10 [00145] Proteínas de los anticuerpos obtenidos de los miembros de la familia del camello y dromedario (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*) incluyendo a los miembros del nuevo mundo, como especies de llama (*Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama Vicugna*) se han caracterizado con respecto al tamaño, complejidad estructural y antigenicidad para sujetos humanos. Ciertos
- 15 anticuerpos IgG de esta familia de mamíferos que se encuentran en la naturaleza carecen de cadenas ligeras, y por tanto son estructuralmente distintos de la estructura cuaternario de cuatro cadenas típica que tiene dos cadenas ligeras y dos pesadas, para los anticuerpos de otros animales. Ver PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 publicada el 3 de marzo de 1994).
- 20 [00146] Una región del anticuerpo de camélido que es el dominio variable único pequeño identificado como VHH se puede conseguir mediante ingeniería genética para producir una proteína pequeña que tiene alta afinidad para una diana, lo que resulta en una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como un "nanocuerpo camélido ". Ver Patente EE.UU
- 25 No. 5,759,808 issued Jun. 2, 1998; véase también Stijlemans, B., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M., 2003 Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. 2002 Int J Cancer 89: 456-62; yLauwereys, M. 1998 EMBO J 17: 3512-3520. Bibliotecas modificadas de anticuerpos camelidos y fragmentos de anticuerpos están
- 30 comercialmente disponibles, por ejemplo, en Ablynx, Ghent, Belgica. Al igual que con otros anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede

alterarse de manera recombinante para obtener una secuencia que se asemeja más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo puede ser "humanizado". Así, la antigenicidad natural baja de anticuerpos de camélidos para los seres humanos puede reducirse aún más.

5 [00147] El nanocuerpo camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de una molécula de IgG humana, y la proteína tiene un diámetro físico de sólo unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de nanocuerpos camélidos de unirse a sitios antigénicos que son funcionalmente invisibles para proteínas
10 de anticuerpo más grandes, es decir, nanocuerpos camélidos son útiles como reactivos de detección de los antígenos que son de otra manera crípticos utilizando técnicas inmunológicas clásicas, y como posibles agentes terapéuticos. Así, otra consecuencia del pequeño tamaño es que un nanocuerpo camélido puede inhibir como resultado de la unión a un sitio específico en una
15 ranura o estrecha hendidura de una proteína diana, y por lo tanto puede servir en una capacidad que se asemeja más a la función de un fármaco de bajo peso molecular clásico que la de un anticuerpo clásico.

 [00148] El bajo peso molecular y tamaño compacto resultan además en que los nanocuerpos camélidos son extremadamente termoestables, estable
20 al pH extremo y a la digestión proteolítica, y deficientemente antigénica. Otra consecuencia es que los nanocuerpos camélidos se mueven fácilmente desde el sistema circulatorio a los tejidos, e incluso cruzan la barrera sangre-cerebro y pueden tratar trastornos que afectan al tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar adicionalmente el transporte del fármaco a través de la barrera
25 hematoencefálica. Véase la solicitud de patente EE.UU. 20040161738 publicada el 19 de agosto del 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad para los seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Adicionalmente, estas moléculas pueden ser totalmente expresadas en células procariotas tales como E. coli y se expresan como proteínas de fusión con
30 bacteriófagos y son funcionales.

 [00149] En consecuencia, una característica de la presente invención es un anticuerpo o nanocuerpo camélido que tiene alta afinidad para

TSLP. En una modalidad en la presente, el anticuerpo o nanocuerpo camélido se produce naturalmente en el animal camélido, es decir, es producido por el camélido después de la inmunización con TSLP o un fragmento peptídico del mismo, utilizando las técnicas descritas en la presente para otros anticuerpos.

5 Alternativamente, el nanocuerpo camélido de unión a TSLP es modificado, es decir, producido por selección, por ejemplo, a partir de una biblioteca de fagos que presentan adecuadamente proteínas de nanocuerpos camélidos mutagenizados que utilizan procedimientos de paneo con TSLP como una diana como se describe en los ejemplos en la presente. Los nanocuerpos modificados

10 además se pueden personalizar mediante ingeniería genética para tener una vida media en un sujeto receptor entre 45 minutos y dos semanas. En una modalidad específica, el anticuerpo o nanocuerpo camélido se obtiene al injertar las secuencias CDRs de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos humanos de la invención en el nanocuerpo o secuencia variables de anticuerpos de

15 dominio sencillo, como se describe por ejemplo en PCT/EP93/02214.

Moléculas Biespecíficas y Anticuerpos Multivalentes

[00150] En otro aspecto, la presente invención incluye moléculas biespecíficas o multiespecíficas que comprenden un anticuerpo de unión a TSLP, o un fragmento del mismo, de la invención. El anticuerpo de la invención,

20 o fragmentos de unión a antígenos del mismo pueden derivatizarse o ligarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor), para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión diferentes o moléculas diana. El anticuerpo de la invención pueden en realidad ser derivatizado o ligado a más

25 de una molécula funcional para generar moléculas multi-específicas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; tales moléculas multi-específicas también pretenden ser incluidas por el término “molécula biespecífica” como se utiliza en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede ligarse funcionalmente (por

30 ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de tal manera

que se produzca una molécula biespecífica.

[00151] Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para TSLP y una segunda especificidad de unión por un segundo epítipo diana. Por ejemplo, el segundo epítipo diana puede ser otro epítipo de TSLP diferente del primer epítipo diana. En otras modalidades, el segundo epítipo diana puede ser una diana no relacionada con TSLP, pero que proporciona un beneficio terapéutico en combinación con TSLP.

[00152] Adicionalmente, para la invención en la cual la molécula biespecífica es multi-específica, la molécula puede además incluir una tercera especificidad de unión, además del primero y segundo epítopos diana.

[00153] En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o una cadena Fv sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o un constructo de cadena sencilla como se describió en Ladner Patente EE.UU. No. 4,946,778.

[00154] Los diacuerpos son moléculas bivalentes, biespecíficas en las cuales los dominios VH y VL se expresan sobre una única cadena polipeptídica, conectada por un enlazador que es demasiado corto para permitir pareo entre los dos dominios en la misma cadena. Los dominios VH y VL se aparean con dominios complementarios de otra cadena, creando así dos sitios de unión a antígenos (véase e.j., Holliger, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, 1994 Structure 2:1121-1123). Los diacuerpos se pueden producir mediante la expresión de dos cadenas de polipéptidos, ya sea con la estructura de VHA-VLB y VHB-VLA (configuración VH-VL), o VLA-VHB y VHA VLB- (configuración VL-VH) dentro de la misma célula. La mayoría de éstos se puede expresar en forma soluble en bacterias. Diacuerpos de cadena única (scDb) se producen mediante la conexión de las dos cadenas de polipéptidos formadoras de diacuerpos con enlazador de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos (véase Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45(3-4):128-30;

Wu., 1996 Immunotechnology, 2(1):21-36). scDb puede expresarse en bacterias en forma soluble, activa, monomérica (véase Holliger y Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45 (34): 128-30; Wu., 1996 Immunotechnology, 2 (1):21-36; Pluckthun y Pack, 1997 Immunotechnology, 3 (2): 83-105; Ridgway., 1996 Protein Eng., 9 (7):617-21). Un diacuerpo puede fusionarse a Fc para generar un “di-diacuerpo” (véase Lu et al., 2004 J. Biol. Chem., 279(4):2856-65).

[00155] Otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

10 [00156] Las moléculas biespecíficas de la presente invención se pueden preparar conjugando las especificidades de unión constituyentes, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o entre-cruzamiento pueden utilizarse para conjugación covalente. Ejemplos de agentes entrecruzantes incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-5-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (OPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4 - (N-maleimidometil) ciclohexano-l-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky, (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, (1985) ProcNatl AcadSci EE.UU. 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) BehringIns. Mitt. No. 78.118-132; Brennan, (1985) Science 229:81-83), y Glennie, (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375). Agentes conjugantes son SATA y sulfo SMCC, 25 ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

[00157] Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, estos pueden ser conjugados mediante la unión de sulfhidrilo a las regiones bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En una realización particular, la región de bisagra se modifica para contener un número impar de residuos de sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

30 [00158] Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula

huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb X mAb, mAb X Fab, Fab X F (ab ')² o ligando X Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena única que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la Patente EE.UU No. 5,132,405; U.S. Pat. No. 5,091,513; U.S. Pat. No. 5,476,786; U.S. Pat. No. 5,013,653; U.S. Pat. No. 5,258,498; y U.S. Pat. No. 5,482,858.

[00159] La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse mediante, por ejemplo, ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis FACS, ensayo biológico (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos anticuerpo-proteína de interés particular empleando un reactivo etiquetado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

[00160] En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos multivalentes que comprenden al menos dos porciones de unión a antígeno idénticas o diferentes de los y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la unión de la invención a TSLP. Las porciones de unión al antígeno pueden ligarse juntos a través de la proteína de fusión o unión covalente o no covalente. Alternativamente, los métodos de enlace se han descrito para las moléculas biespecíficas. Los compuestos tetravalentes se pueden obtener por ejemplo al entrecruzar anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de los mismos de la invención con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a las regiones constantes de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, por ejemplo la región Fc o de bisagra.

[00161] Los dominios de trimerización se describen por ejemplo en la patente EP de Borean Pharma 1012280B. Los módulos de pentamerización se describen por ejemplo en PCT/EP97/05897.

Anticuerpos con Vida Media Extendida

[00162] La presente invención proporciona anticuerpos que específicamente se unen a TSLP y que tienen una vida media extendida in vivo.

[00163] Muchos factores pueden afectar la vida media de una proteína in vivo. Por ejemplo, la filtración renal, metabolismo en el hígado, degradación por enzimas proteolíticos (proteasas), y respuestas inmunogénicas (por ejemplo, la neutralización protéica por anticuerpos y absorción por macrófagos y células dendríticas). Una variedad de estrategias pueden utilizarse para extender la vida media de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención. Por ejemplo, mediante enlace químico a polietilenglicol (PEG), reCODE PEG, andamio de anticuerpos, ácido polisiálico (PSA), almidón de hidroxietilo (HES), ligandos de unión a albúmina, y placas de carbohidrato; por fusión genética a proteínas de unión a proteínas séricas, tales como albúmina, IgG, FcRn, y transferir; por acoplamiento (de manera genética o química) a otras fracciones de unión que se unen a las proteínas séricas, tales como nanocuerpos, Fabs, DARPins, avimeros, aficuerpos y anticalinas; por fusión genética a RPEG, albúmina, dominio de albúmina, proteínas de unión a albúmina y Fc, o por la incorporación en nanovehículos, formulaciones de liberación lenta, o dispositivos médicos.

[00164] Para prolongar la circulación sérica de anticuerpos in vivo, moléculas poliméricas inertes tales como PEG de alto peso molecular pueden ser fijadas a los anticuerpos con o sin un enlazador multifuncional ya sea a través de conjugación específica a sitio del PEG al extremo N o C de los anticuerpos o a través de grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se adhieren al anticuerpo o fragmento del mismo. La pegilación puede realizarse por una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se utiliza en la presente, el término "polietilenglicol" se pretende que abarque cualquiera de las formas de PEG que han sido utilizadas para derivatizar

5 otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En una modalidad, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Se puede utilizar derivatización de polímero lineal o ramificado que resulta en una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación puede ser estrechamente monitoreado por SDS-PAGE y espectrometría de masas para garantizar la conjugación apropiada de moléculas PEG al anticuerpo. PEG sin reaccionar se puede separar de anticuerpo-conjugados PEG mediante exclusión por tamaño o mediante cromatografía de intercambio iónico. Los anticuerpos derivados de PEG pueden probarse para la actividad de unión, así como para la eficacia in vivo utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante los inmunoensayos descritos en la presente. Métodos para proteínas de pegilación se conocen en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención. Véase por ejemplo, el documento EP 0 154 316 por Nishimura, Y EP 0 401 384 por Ishikawa).

[00165] Otras tecnologías de pegilación modificadas incluyen tecnología de modificación dirigida ortogonal químicamente reconstructiva (ReCODE PEG), que incorpora cadenas laterales químicamente definidas en proteínas biosintéticas a través de un sistema reconstituido que incluye ARNt sintetasa y ARNt. Esta tecnología permite la incorporación de más de 30 nuevos aminoácidos en las proteínas biosintéticas en células de E. coli, de levadura y mamíferas. El tRNA incorpora un aminoácido no nativo en cualquier lugar que un codón ámbar esté posicionado, convirtiendo el ámbar de un codón de parada a uno que indica la incorporación del aminoácido químicamente definido.

25 [00166] La tecnología de pegilación recombinante (rPEG) también se puede utilizar para la extensión de vida media sérica. Esta tecnología consiste en la fusión genética de cola de proteína no estructurada de 300-600 aminoácidos a la proteína farmacéutica existente. Debido a que el peso molecular aparente de dicha cadena de proteína no estructurada es aproximadamente 15 veces mayor que su peso molecular real, la vida media en suero de la proteína será mucho mayor. En contraste a la pegilación tradicional, que requiere la conjugación química y repurificación, el proceso de fabricación

se simplifica enormemente y el producto es homogéneo.

[00167] La polisialización es otra tecnología, que utiliza el polímero natural PSA para prolongar la vida activa y mejorar la estabilidad de los péptidos y proteínas terapéuticas. PSA es un polímero de ácido siálico (un azúcar).
5 Cuando se utiliza para la administración de proteínas y medicamentos peptídicos terapéuticos, el ácido polisialico proporciona un microambiente protector sobre la conjugación. Esto aumenta la vida activa de la proteína terapéutica en la circulación y evita que sea reconocido por el sistema inmune. El polímero PSA se encuentra naturalmente en el cuerpo humano. Fue adoptado por ciertas
10 bacterias que evolucionaron durante millones de años para recubrir las paredes de la misma. Estas bacterias naturalmente polisialilazadas fueron capaces, en virtud de mimetismo molecular, de frustrar el sistema defensivo del cuerpo. PSA, la tecnología de sigilo óptima de la naturaleza, puede producirse fácilmente a partir de dichas bacterias en grandes cantidades y con determinadas
15 características físicas. PSA bacteriano es completamente no inmunogénico, incluso cuando se acopla a proteínas, ya que es químicamente idéntico al PSA en el cuerpo humano.

[00168] Otra tecnología incluye el uso de derivados de almidón de hidroxietilo ("HES") vinculados a los anticuerpos. HES es un polímero natural
20 modificado derivado de almidón de maíz ceroso y puede ser metabolizado por las enzimas del cuerpo. Soluciones de HES se administran normalmente para sustituir el volumen de sangre deficiente y para mejorar las propiedades reológicas de la sangre. La hesilación de un anticuerpo permite la prolongación de la vida media en circulación al aumentar la estabilidad de la molécula, así
25 como mediante la reducción de la depuración renal, lo que resulta en una actividad biológica aumentada. Mediante la variación de diferentes parámetros, tales como el peso molecular de HES, una amplia gama de conjugados de anticuerpos HES se pueden personalizar.

[00169] Anticuerpos que tienen una vida media aumentada in vivo
30 también pueden generarse introduciendo una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, inserciones o supresiones) en un dominio constante de IgG, o fragmento de unión a FcRn del mismo (preferiblemente un

fragmento de dominio de Fc bisagra o fragmento de dominio Fc) . Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional No. WO 98/23289; Publicación Internacional No. WO 97/34631, y la patente EE.UU. No. 6.277.375. No. 6,277,375.

5 [00170] Además, los anticuerpos pueden conjugarse a albúmina con el fin de que los anticuerpos sean más estables in vivo o tengan una vida media in vivo más prolongada. Las técnicas son bien conocidas en la técnica, véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N^o WO 93/15199, WO 93/15200, y WO 01/77137, y la patente EP Europea No. 413.622.

10 [00171] Las estrategias para aumentar la vida media son especialmente útiles en nanocuerpos, aglomerantes basados en fibronectina, y otros anticuerpos o proteínas para los cuales se desea vida media in vivo aumentada.

Conjugados de Anticuerpos

15 [00172] La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen específicamente al dominio extracelular de TSLP fusionado de manera recombinante o conjugado químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes como no covalentes) a una proteína o polipéptido heterólogo (o un fragmento de unión al antígeno del mismo, preferiblemente a un polipéptido de al menos 10 , al menos 20, al menos 20 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo descritos en la presente (por ejemplo, un 25 fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F (ab) 2, un dominio VH, un CDR VH, un dominio VL o un CDR VL) y una proteína heteróloga, polipéptido o péptido. Los métodos para fusionar o conjugar proteínas, polipéptidos, o péptidos a un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo son conocidos en la técnica. Véase, Pat. EE.UU Nos. 5,336,603, 5,622,929, 5,359,046, 5,349,053, 30 5,447,851, y 5,112,946; Patente EP Europea Nos. 307,434 y EP 367,166; Publicación Internacional Nos. WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 10535-10539; Zheng., 1995, J. Immunol.

154:5590-5600; y Vil., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:11337-11341.

[00173] Proteínas de fusión adicionales pueden generarse a través de las técnicas de transposiciones genéticas, transposiciones de motivos, transposiciones de exones, y/o transposiciones de codones (denominados de manera colectiva "transposiciones de ADN"). Las transposiciones de ADN pueden emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos con afinidades mayores y tasas de disociación menores). Veáse, en general Pat. EE.UU. Nos. 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, y 5,837,458; Patten., (1997) Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson., (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76; y Lorenzo and Blasco, (1998) Biotechniques 24(2):308-313 (cada una de estas patentes y publicaciones se incorporan como referencia en su totalidad). Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, o los anticuerpos codificados y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, pueden ser alterados al ser sometidos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la región del tallo de TSLP puede ser recombinada con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc de una o más moléculas heterólogas.

[00174] Además, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En una modalidad, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina (SEQ ID NO: 40), tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc, 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86:821-824, por ejemplo, la hexa-histidina(SEQ ID NO: 40) proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la

etiqueta de hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la influenza (Wilson, (1984) Cell 37:767), y la etiqueta "bandera".

[00175] En una modalidad, anticuerpos y fragmentos de unión al
5 antígeno de los mismos de la presente invención o fragmentos de unión al antígeno de los mismos conjugados con un agente de diagnóstico o detectable. Tales anticuerpos pueden ser útiles para monitorear o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como la determinación de la eficacia
10 de una terapia particular. Tal diagnóstico y detección se puede lograr mediante el acoplamiento de los anticuerpos a sustancias detectables incluyendo, pero no limitando a, enzimas diversas, tales como, pero no limitadas a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no se limitan a, streptavidin/biotina y
15 avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitado a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina- fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero no limitado a, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero no limitados a, luciferina, luciferasa y
20 aecurina, materiales radiactivos, tales como, pero no limitado a, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, y ¹²¹I),, carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In y,), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru,
25 ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn y ¹¹⁷Tm y metales emisores de positrones que utilizan varias tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radioactivos.

[00176] Además, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede conjugarse a una fracción terapéutica o fracción farmacológica.
30 Las fracciones terapéuticas o fracciones farmacológicas no han de interpretarse como limitadas a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacológica puede ser una proteína, péptido o polipéptido que posee

una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, toxina del cólera o toxina diftérica, una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, alfa-interferón, beta-interferón, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, un agente anti-angiogénico, o, un modificador de respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina.

[00177] Además, un anticuerpo puede conjugarse a las fracciones terapéuticas tales como un ión metálico radioactivo, tal como emisores alfa tales como ²¹³Bi o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, incluyendo pero sin limitarse a, ¹³¹In, ¹³¹Lu, ¹³¹Y, ¹³¹Ho, ¹³¹Sm, a polipéptidos. En una modalidad, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''-tetraacético (DOTA) el cual puede conectarse al anticuerpo a través de una molécula de enlace. Tales moléculas de enlace son comúnmente conocidas en la técnica y se describen en Denardo, (1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson, (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; y Zimmerman, (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, cada uno incorporado por referencia en su totalidad.

[00178] Las técnicas para conjugar fracciones terapéuticas con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Anticuerpos Monoclonales y Terapia contra el Cáncer, Reisfeld. (Eds.), pp 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom, "Antibodies For Drug Delivery", en Administración Controlada de Fármacos (2ª ed.), Robinson, (Eds.), pp 623-53 (Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Anticuerpos Monoclonales 84: Aplicaciones Biológicas y Clínicas, Pinchera (Eds.), pp 475-506 (1985), "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Anticuerpos Monoclonales para Detección y Terapia contra el Cáncer, Baldwin (Eds.), pp 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe, (1982) Immunol. Rev. 62:119-58.

[00179] Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos,

que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Tales soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Ácidos Nucleicos que Codifican los Anticuerpos

5 [00180] La invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de los anticuerpos de TSLP descritos anteriormente. Tales polinucleótidos pueden codificar al menos una región CDR y por lo general todas las tres regiones CDR a partir de cadena pesada o ligera de los anticuerpos
10 de TSLP descritos en este documento. Tales polinucleótidos también pueden codificar la totalidad o sustancialmente todas las secuencias de región variable de la cadena pesada y/o cadena ligera de los anticuerpos de TSLP descritos en este documento. Tales polinucleótidos también pueden codificar tanto una región variable y una región constante del anticuerpo. Debido a la degeneración
15 del código, una variedad de secuencias de ácido nucleico codificarán cada una de las secuencias de amino ácidos de inmunoglobulina.

[00181] Las secuencias polinucleotídicas pueden ser producidas por síntesis de ADN de fase sólida de novo o mediante mutagénesis PCR de una secuencia existente (ej., secuencias como se describe en los Ejemplos a
20 continuación) que codifica un anticuerpo de unión a TSLP o su fragmento de unión. Síntesis química directa de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica, tales como el método del fosfotriéster de Narang, Meth. Enzymol. 68:90, 1979; el método de fosfodiéster de Brown, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage, Tetra.
25 Lett., 22:1859, 1981; y el método de soporte sólido de la Patente EE.UU. No. 4.458.066. La introducción de mutaciones en una secuencia de polinucleótidos por PCR se puede realizar como se describe en, por ejemplo, Tecnología PCR: Principios y Aplicaciones para la amplificación de ADN, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, Nueva York, Nueva York, 1992; PCR Protocols: Una guía para
30 Métodos y Aplicaciones, Innis. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif., 1990; Mattila., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; y Eckert., PCR Métodos y Aplicaciones 1:17, 1991.

[00182] También se proporciona en la invención, vectores de expresión y células huésped para la producción de los anticuerpos de unión a TSLP-descritos anteriormente. Varios vectores de expresión pueden emplearse para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos de unión a TSLP o fragmentos de unión. Vectores de expresión tanto basados en virus como no virales pueden utilizarse para producir los anticuerpos en una célula hospedera mamífera. Vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, por ejemplo, Harrington, Nat Genet 15:345,1997). Por ejemplo, vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos de unión a TSLP y polipéptidos en células mamíferas (por ejemplo, humanas) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV, y muchos otros vectores conocidos en la técnica por expresar otras proteínas. Vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores de virus vaccinia y virus Semliki Forest (SFV). Véase, Brent, (1995) supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; y Rosenfeld., Cell 68:143, 1992.

[00183] La elección del vector de expresión depende de las células huésped deseadas en las cuales el vector se va a expresar. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadoras) que están enlazadas operativamente a los polinucleótidos que codifican un fragmento de unión al antígeno de cadena de anticuerpo de unión a TSLP. En una modalidad, un promotor inducible es empleado para evitar la expresión de secuencias insertadas, excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo, arabinosa, lacZ, promotor de la metalotioneína o un promotor de choque térmico. Cultivos de organismos transformados pueden ampliarse bajo condiciones de no inducción sin sesgar la población a secuencias de codificación cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huésped. Además de promotores, otros elementos reguladores también pueden ser necesarios o

deseados para la expresión eficaz de una cadena de anticuerpo de unión a TSLP o fragmento de unión al antígeno. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión a ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficiencia de expresión puede potenciarse por la
5 inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, por ejemplo, Scharf, (1994) *Results Probl Cell Differ* 20:125; y Bittner, (1987) *Meth. Enzymol.*, 516:1987). Por ejemplo, el potenciador SV40 o potenciador CMV pueden usarse para aumentar la expresión en células huésped mamíferas.

[00184] Los vectores de expresión también pueden proporcionar
10 una posición de secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias insertadas de anticuerpos de unión a TSLP. Más a menudo, las secuencias insertadas de anticuerpos de unión a TSLP están ligadas a secuencias señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores que se utilizan para recibir secuencias que codifican los dominios
15 variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos de unión a TSLP algunas veces también codifican las regiones constantes o partes de la misma. Tales vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes conduciendo así a la producción de anticuerpos intactos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos.
20 Típicamente, tales regiones constantes son humanas.

[00185] Las células hospederas para albergar y expresar las cadenas de anticuerpo de unión a TSLP pueden ser procariotas o eucariotas. E. coli es un hospedero procariota útil para clonación y expresión de los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos
25 adecuados para utilizar incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y varias especies de *Pseudomonas*. En estos hospederos procariotas, también se pueden fabricar vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de
30 replicación). Además, cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos estará presente, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa, o

un sistema promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción. Otros microbios, tales como levadura, también pueden emplearse para expresar polipéptidos de unión a TSLP de la invención. También pueden utilizare células de insecto en combinación con vectores de baculovirus.

[00186] En una modalidad, las células hospederas mamíferas se utilizan para expresar y producir los polipéptidos de unión a TSLP de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser bien sea una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógena (ej., el clon de hibridoma de mieloma 1D6.C9 como se describe en los Ejemplos) o una línea celular mamífera que alberga un vector de expresión exógeno (ej., las células de mieloma SP2/0 ejemplificadas a continuación). Estos incluyen cualquier célula animal o humana mortal o normal o normal o inmortal anormal. Por ejemplo, un número de líneas de células hospederas adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas se han desarrollado incluyendo líneas de células CHO, varias líneas de celulas Cos, células HeLa, líneas de células de mieloma, células B transformadas e hibridomas. El uso de cultivo celular de tejido mamífero para expresar polipéptidos se discute en general en, ej., Winnacker, DE GENES A CLONES, VCH Publishers, Nueva York, NY, 1987. Los vectores de expresión para células hospederas mamíferas pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, y un potenciador (véase, ej., Queen, Immunol. Rev. 89: 49-68, 1986), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras de la transcripción. Estos vectores de expresión contienen generalmente promotores derivados de genes mamíferos o de virus mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específico al tipo celular, específicos a la etapa, y/o modulables o regulables. Promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de la metalotioneína, el promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, el promotor dexametasona de MMTV, el promotor SV40, el promotor MRP polIII, el promotor MPSV constitutivo, el promotor inducible por tetraciclina

de CMV (tal como el promotor temprano inmediato CMV humano), el promotor CMV constitutivo, y combinaciones potenciadoras del promotor conocidas en la técnica.

[00187] Métodos para la introducción de vectores de expresión que
5 contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo en el tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o electroporación puede utilizarse para otros huéspedes celulares. (Véase en general Sambrook, , Supra). Otros métodos incluyen, por
10 ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, policación: conjugados de ácidos nucleicos, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, (1997) Cell 88:223), agente potenciador de captación de
15 ADN, y transducción ex vivo. Para producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, a menudo se desea expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable cadenas de anticuerpos de unión a TSLP o fragmentos de unión pueden prepararse utilizando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes de replicación virales o
20 elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Tras la introducción del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que se cambien a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento de células que expresan con éxito las secuencias
25 introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas establemente se pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Generación de Anticuerpos y Fragmentos de Anticuerpos

[00188] Los anticuerpos monoclonales (mAbs) pueden producirse
30 mediante un a variedad de técnicas incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales ej., la técnica de hibridización celular somática estándar de Kohler y Milstein, 1975 Nature 256: 495. Muchas técnicas para

producir anticuerpos monoclonales pueden emplearse ej., transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

5 [00189] Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. Producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de
esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. También se conocen socios de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

10 [00190] En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanizados. Los anticuerpos quiméricos o humanizados y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo murino monoclonal preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que
15 codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera se puede obtener a partir del hibridoma murino de interés y se puede modificar para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) utilizando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden vincularse a regiones
constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por
20 ejemplo, la patente de EE.UU. No. 4.816.567 concedida a Cabilly). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en una estructura humana usando métodos conocidos en la técnica. Véase ej., Pat. EE UU No. 5,225,539 a Winter, y Pat. EE.UU. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6180370 a Queen.

25 [00191] En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra TSLP se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y ratones
30 transcromosómicos incluyen ratones conocidos en la presente como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en este documento como "ratones Ig humanos".

[00192] El HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) contiene minisitos de genes de inmunoglobulinas humanas que codifican secuencias de inmunoglobulinas no reordenadas de cadena pesada (mu y gamma) y de cadena ligera kappa junto con mutaciones sobre las cuales se puede actuar que inactivan los sitios endógenos de cadena mu y kappa (véase, por ejemplo, 5 Lonberg, 1994 Nature 368 (6474): 856-859). En consecuencia, los ratones muestran una disminución de expresión de IgM de ratón o K, y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos humanos de cadena pesada y ligera se someten a cambio de clase y mutación somática para generar hlgGk-kappa 10 monoclonal humano de alta afinidad (Lonberg, N., (1994) supra ; revisado en Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg N. y Huszar, D., 1995 Intern Rev. Immunol.13: 65-93, y Harding F. y Lonberg, N., 1995 Ann NY Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describe adicionalmente en Taylor, L., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287- 15 6295; Chen, J., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuaillon., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi ., 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L., 1994 International Immunology 579-591; y Fishwild, D., 1996 20 Nature Biotechnology 14: 845-851, los contenidos de todos se incorporan específicamente por referencia en su totalidad. Véase también, Pat. EE.UU. Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todos a Lonberg y Kay; Pat. EE.UU. No. 5,545,807 a Surani; Publicación PCT Nos. WO 92103918, WO 93/12227, WO 25 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y and WO 99/45962, todos a Lonberg y Kay; y PCT Publicación No. WO 01/14424 a Korman.

[00193] En algunas modalidades, los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando un ratón que lleva las secuencias de inmunoglobulina humana en los transgenes y transcromosomas tal como un ratón que lleva un 30 transgén humano de cadena pesada y un transcromosoma humano de cadena ligera. Tales ratones, conocidos en la presente como "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 a Ishida.

[00194] Aún más, los sistemas alternativos de animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden utilizar para elevar los anticuerpos de unión a TSLP y fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo conocido como el XenoMouse (Abgenix, Inc.) se puede utilizar. Tales ratones se describen en, por ejemplo, Patentes de EE.UU. Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6, 6.150.584 y 6.162.963 a Kucherlapati.

[00195] Además, los sistemas alternativos de animales transcrómicos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se puede utilizar para elevar los anticuerpos de unión a TSLP de la invención. Por ejemplo, los ratones que llevan tanto un transcrósoma cadena pesada humana y un transcrósoma cadena ligera humana, conocidos como "ratones TC" pueden ser utilizados; tales ratones se describen en Tomizuka ., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97:722-727. Además, las vacas que llevan transcrósomas humanos de cadena pesada y ligera se han descrito en la técnica (Kuroiwa et al, 2002 Nature Biotechnology 20:. 889-894) y se puede utilizar para elevar anticuerpos de unión a TSLP de la invención.

[00196] Los anticuerpos monoclonales humanos también se pueden preparar usando métodos de presentación en fagos para la selección de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos humanos son establecidos en la técnica o se describen en los ejemplos a continuación. Véase, por ejemplo: Pat. EE.UU. Nos. 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 a Ladner et al; Pat. EE.UU. Nos. 5,427,908 y 5,580,717 a Dower; Pat. EE.UU. Nos. 5,969,108 y 6,172,197 a McCafferty; y Pat. EE.UU. Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 a Griffiths.

[00197] Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también se pueden preparar usando ratones SCID en los cuales las células inmunes humanas se han reconstituido tal que una respuesta de anticuerpos humanos puede generarse tras la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, Patentes de EE.UU. Nos. 5.476.996 y 5.698.767 otorgada a Wilson.

[00198] Los fragmentos de anticuerpos Fab, o Fabs, se pueden generar mediante la digestión de anticuerpos monoclonales con papaína y luego se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad. Fabs también se pueden generar por sintetización recombinante utilizando los ácidos nucleicos
5 que codifican el Fab como se describe anteriormente. Los fragmentos Fab pueden retener la especificidad y/o actividad de unión de una molécula IgG completa, pero son más pequeños en tamaño y tienen pesos moleculares inferiores, que los pueden hacer adecuados para diferentes aplicaciones que las moléculas IgG completas.

10 **Modificaciones del marco o de Fc**

[00199] Los anticuerpos genéticamente modificados y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a los residuos variables dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente tales
15 modificaciones de marco están hechas para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retro mutar" uno o más residuos de región variable a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sido objeto de mutación somática puede contener residuos del marco que difieren de la secuencia de línea
20 germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden ser identificados mediante la comparación de las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de las que se deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región variable a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas pueden ser "retromutadas" a la
25 secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio. Tales anticuerpos "retromutados" también pretenden ser contemplados por la invención.

[00200] Otro tipo de modificación marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más
30 regiones CDR, para eliminar epítomos de células T para disminuir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de

patente de EE.UU. No. 20030153043 por Carr et al.

[00201] Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser diseñados para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para
5 alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede ser modificado químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas se pueden unir al anticuerpo) o se pueden modificar para alterar su glicosilación, de
10 nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe en más detalle a continuación. La numeración de los residuos en la región Fc es del índice EU de Kabat.

[00202] En una realización, la región de bisagra de CH1 puede ser modificada de tal manera que el número de residuos de cisteína en la región
15 bisagra se altera, por ejemplo, se aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 5.677.425 por Bodmer. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

[00203] En otra modalidad la región de bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más
20 específicamente, una o más mutaciones aminoácidas se introducen en la región de interfaz de dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de tal manera que el anticuerpo queda con una unión defectuosa a SpA (proteína estafilocócica A)
25 con relación a la unión nativa de SpA con el dominio Fc-bisagra. Este enfoque se describe en detalle adicional en la Patente EE.UU. No. 6.165.745 por Ward et al.

[00204] En otra modalidad, el anticuerpo puede ser modificado para aumentar su vida media biológica. Diversos enfoques son posibles. Por ejemplo,
30 una o más de las siguientes mutaciones pueden ser introducidas: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de los Estados Unidos. No. 6.277.375 concedida a Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el

anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor silvestre tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en la patente de EE.UU. Nos. 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

5 [00205] En una modalidad, la región Fc puede ser alterada mediante la sustitución de al menos un residuo aminoácido por un residuo aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden ser sustituidos por un residuo aminoácido diferente de manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector
10 pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector al que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe en mayor detalle en las patentes de EE.UU. Nos. 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter et al.

15 [00206] En otra modalidad, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos por un residuo de aminoácido diferente tal que el anticuerpo tenga unión unión de C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) abolida y/o disminuida. Este enfoque se describe en detalle adicional en la Patente EE.UU. No. 6,194,551 por
20 Idusogie et al.

 [00207] En otra modalidad, uno o más residuos de aminoácidos se pueden alterar para alterar la capacidad del anticuerpo para fijarse al complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer et al.

25 [00208] En aún otra modalidad, la región Fc puede ser modificada para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc-gamma mediante la modificación de uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072
30 por Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para Fc-gamma RI, Fc-gamma RII, Fc-gamma RIII y FcRn se han mapeado y las variantes con unión mejorada se han descrito (véase Shields et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-

6604).

[00209] En aún otra modalidad, la glicosilación de un anticuerpo es modificada. Por ejemplo, un anticuerpo aglicosilado puede fabricarse (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el “antígeno”. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, mediante la alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos pueden realizarse que resulten en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del marco de región variable para eliminar así la glicosilación en dicho sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe en mayor detalle en la patente de EE.UU. Nos. 5.714.350 y 6.350.861 por Co et al.

[00210] Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede ser hecho que tenga un tipo de alteración de la glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosil o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNAc de bisección aumentada. Tales patrones de glicosilación alterados han demostrado que aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden utilizar como células huésped para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención para producir con ello un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hang, describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 por Presta describe una línea celular CHO variante, células Lecl3, con una capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos unidos por Asn (297), resultando también en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (véase también Shields., R. L., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 por

Umana et al. describe líneas celulares modificadas genéticamente para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteínas (por ejemplo, beta (1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de tal manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas presenten estructuras de GlcNAc de bisección aumentada que resulta en actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

Métodos para Modificar Anticuerpos Alterados

[00211] Como se discutió anteriormente, los anticuerpos de unión a TSLP que tienen secuencias VH y VL o secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa mostradas en la presente pueden utilizarse para crear nuevos anticuerpos de unión a TSLP mediante la modificación de las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de longitud completa, secuencias VH y/o VL, o la región constante unida a las mismas. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, las características estructurales del anticuerpo de unión a TSLP de la invención se utilizan para crear anticuerpos de unión de TSLP estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, tal como la unión a TSLP humana.

[00212] Por ejemplo, una o más regiones CDR de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención, o mutaciones de los mismos, se pueden combinar de forma recombinante con regiones de estructura conocida y/o otros CDR para crear de forma recombinante por ingeniería, anticuerpos adicionales de unión a TSLP y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de modificación es una o más de las secuencias VH y/o VL proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo manipulado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más secuencias VH y/o VL proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la(s) secuencia(s) se utiliza como material de partida para crear una secuencia de "segunda

generación" derivada de la secuencia original (s) y luego las secuencias de "segunda generación" se preparan y expresan como una proteína.

5 [00213] La secuencia alterada de anticuerpos también se puede preparar al seleccionar bibliotecas de anticuerpos que tienen secuencias CDR3 fijas o determinantes de unión esenciales como se describe en US20050255552 y diversidad en las secuencias CDR1 y CDR2. La selección se puede realizar de acuerdo con cualquier tecnología de selección adecuada para selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de anticuerpos, tales como tecnología de presentación en fagos.

10 [00214] Las técnicas estándar de biología molecular se pueden utilizar para preparar y expresar la secuencia alterada de anticuerpos. El anticuerpo codificado por la(s) secuencia (s) de anticuerpo alterado es aquel que conserva una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos de unión a TSLP descritos en este documento, tales propiedades funcionales incluyen, pero no se limita a específicamente unir y estabilizar humana proteína TSLP.

[00215] Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar usando ensayos estándares disponibles en la técnica y/o divulgados en la presente, tales como los indicados en los ejemplos (por ejemplo, ELISA).

20 [00216] En algunas modalidades, los métodos de modificación de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención, se pueden introducir mutaciones al azar o selectivamente a lo largo de toda o parte de una secuencia de codificación de anticuerpos de unión a TSLP y los anticuerpos de unión a TSLP resultantes modificados pueden ser clasificados para la actividad de unión y/o otras propiedades funcionales como se describe en la presente. Se han descrito métodos mutacionales en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para la creación y selección de mutaciones de anticuerpos por medio de mutagénesis de saturación, montaje de ligación sintética, o una combinación de los mismos.

25

30 Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 por Lazar describe métodos de uso de métodos computacionales de detección para optimizar las

propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Caracterización de los Anticuerpos de la Invención

[00217] Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden caracterizar por diversos ensayos
5 funcionales. Por ejemplo, se pueden caracterizar por su capacidad de unirse a TSLP e inhibir la actividad de TSLP.

[00218] La capacidad de un anticuerpo para unirse a TSLP se puede detectar al marcar el anticuerpo de interés directamente, o el anticuerpo puede estar sin marcar y la unión detectarse indirectamente usando diversos formatos
10 de ensayo tipo sándwich conocidos en la técnica.

[00219] En algunas modalidades, los anticuerpos de unión a TSLP y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención bloquean o compiten con la unión de un anticuerpo de unión a TSLP de referencia al polipéptido de TSLP. Estos pueden ser anticuerpos de unión a TSLP
15 completamente humanos o humanizados descritos anteriormente. También pueden ser otros anticuerpos de unión a TSLP humanos, de ratón, quiméricos o humanizados que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. La capacidad para bloquear o competir con la unión del anticuerpo de referencia indica que un anticuerpo de unión a TSLP bajo prueba se une al mismo epítipo
20 o epítipo similar al definido por el anticuerpo de referencia, o a un epítipo que está suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de unión a TSLP de referencia. Tales anticuerpos son especialmente propensos a compartir las ventajosas propiedades identificadas para el anticuerpo de referencia. La capacidad para bloquear o competir con el anticuerpo de referencia se puede
25 determinar por, ej., un ensayo de unión de competencia. Con un ensayo de unión de competencia, el anticuerpo bajo ensayo se examina para la capacidad de inhibir la unión específica del anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como un polipéptido TSLP. Un anticuerpo de ensayo compite con el anticuerpo de referencia por la unión específica al antígeno en caso de que un
30 exceso del anticuerpo de ensayo inhiba sustancialmente la unión del anticuerpo de referencia. Inhibición sustancial significa que el anticuerpo de ensayo reduce la unión específica del anticuerpo de referencia por lo general por lo menos 10%,

25%, 50%, 75%, o 90%.

[00220] Existe un número de ensayos de unión de competencia conocidos que se pueden utilizar para evaluar la competencia de un anticuerpo con un anticuerpo de referencia por la unión a una proteína particular, en este caso, TSLP. Estos incluyen, ej., radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición de sandwich (ver Stahl, *Methods in Enzymology* 9: 242-253, 1983); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (véase Kirkland, *J. Immunol.* 137: 3614-3619, 1986); ensayo etiquetado directo de fase sólida, ensayo de sandwich etiquetado directo de fase sólida (véase Harlow y Lane, *supra*); RIA marcado directo de fase sólida que utiliza la etiqueta I-125 (véase Morel, *Molec. Immunol.* 25: 7-15, 1988); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (Cheung, *Virology* 176: 546-552, 1990); y RIA etiquetado directo (Moldenhauer, *Scand. J Immunol.* 32:77-82, 1990). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de éstos, un anticuerpo de unión a TSLP de prueba no marcado y un anticuerpo de referencia marcado. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o las células en presencia del anticuerpo de ensayo. Por lo general, el anticuerpo de prueba está presente en exceso. Anticuerpos identificados mediante el ensayo de competición (anticuerpos que compiten) incluyen los anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca impedimento estérico.

[00221] Para determinar si los anticuerpos monoclonales de unión a TSLP seleccionados se unen a epítipos únicos, cada anticuerpo puede ser biotinilado utilizando reactivos comercialmente disponibles (ej., reactivos de Pierce, Rockford, Ill.). Los estudios de competición que utilizan anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados se pueden realizar usando placas ELISA recubiertas con polipéptido TSLP. La unión de anticuerpos monoclonales biotinilados puede detectarse con una sonda de fosfatasa strep-avidina-alcalina. Para determinar el isotipo de un anticuerpo

purificado de unión a TSLP, pueden realizarse ELISAs de isotipos. Por ejemplo, los pozos de placas de microtitulación pueden revestirse con 1 μ g/ml de IgG anti-humana durante la noche a 4 °C. Después del bloqueo con BSA al 1%, las placas se hacen reaccionar con 1 μ g/ml o menos de anticuerpo monoclonal de unión a TSLP o controles de isotipos purificados, a temperatura ambiente durante una a dos horas. Luego los pozos se pueden hacer reaccionar con cualquiera de IgG humana o sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específicas a IgM humana. Luego las placas se desarrollan y analizan de manera que el isotipo del anticuerpo purificado se puede determinar.

10 [00222] Para demostrar la unión de anticuerpos monoclonales de unión a TSLP a células vivas que expresan un polipéptido TSLP, se puede utilizar citometria de flujo. Brevemente, las líneas celulares que expresan TSLP (cultivadas bajo condiciones estándar de crecimiento) se pueden mezclar con diversas concentraciones de un anticuerpo de unión a TSLP en PBS
15 conteniendo BSA al 0,1% y suero de ternero fetal al 10%, y se incubarán a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar, las células se hacen reaccionar con anticuerpo IgG anti-humano marcado con fluoresceína bajo las mismas condiciones que la tinción de anticuerpo primario. Las muestras pueden ser analizadas mediante un instrumento FACScan usando propiedades de dispersión lumínica y lateral para
20 el paso de células una por una. Un ensayo alternativo que utiliza microscopia de fluorescencia puede ser utilizado (además de o en vez de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden ser teñidas exactamente como se describió anteriormente y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero pueden tener
25 sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

[00223] Los anticuerpos de unión a TSLP o fragmentos de unión a antígenos de los mismos de la invención se pueden probar adicionalmente para reactividad con un polipeptido TSLP o fragmento antigénico por Western blotting. Brevemente, polipéptidos purificados de TSLP o las proteínas de fusión, o
30 extractos celulares a partir de células que expresan TSLP se pueden preparar y someter a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfirieron a

membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con suero de ternero fetal al 10%, y se sondearon con los anticuerpos monoclonales a ser probados. La unión de IgG humana puede ser detectada usando fosfatasa alcalina de IgG anti-humana y se desarrolló con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

- 5 [00224] Ejemplos de ensayos funcionales se describen también en la sección de Ejemplos a continuación.

Composiciones y Formulaciones Farmacéuticas

- 10 [00225] También se proporcionan en la presente composiciones, ej., composiciones farmacéuticas, que comprenden una o más moléculas, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, minicuerpo, o diacuerpo, que se unen específicamente a TSLP, como el ingrediente activo.

- 15 [00226] Las composiciones farmacéuticas típicamente incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un excipiente farmacéuticamente aceptable pueden incluir salina, solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes isotónicos y de absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se formulan típicamente para que sean compatibles con su vía de administración prevista. Por ejemplo, para la
- 20 administración por inhalación, los compuestos pueden ser liberados en la forma de un spray en aerosol a partir de un contenedor presurizado o dispensador que contiene un propelente apropiado, ej., un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Tales métodos incluyen los descritos en la Patente EE.UU. N° 6.468.798.

- 25 [00227] En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento se formulan para la administración dirigida al tracto respiratorio de un sujeto, especialmente el pulmón del sujeto. Tal formulación puede desviar la deposición del ingrediente activo en el tracto respiratorio superior del sujeto, minimizando de este modo problemas de
- 30 tolerancia o de seguridad asociados con la deposición del fármaco en la boca y la garganta. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento se formulan como una formulación de polvo

seco. Tal formulación en polvo seco puede incluir el ingrediente activo, un excipiente formador de recubrimiento, un excipiente formador de la matriz, y un agente tampón.

Ingrediente Activo

5 [00228] Los ingredientes activos de las formulaciones en polvo seco pueden incluir uno o más de los anticuerpos anti-TSLP y fragmentos de anticuerpos como se describe en la presente.

 [00229] La cantidad de ingrediente activo en la formulación farmacéutica se puede ajustar para suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo por dosis unitaria para lograr el resultado deseado. En la práctica, esto variará ampliamente dependiendo del ingrediente particular, su actividad, la gravedad de la afección a tratar, la población de pacientes, los requisitos de la dosificación, el efecto terapéutico deseado y las cantidades relativas de aditivos contenidos en la composición. La composición contendrá
15 generalmente entre 1% y 99% aproximadamente por peso del ingrediente activo, por ejemplo, entre 5% y 95% aproximadamente, entre 10% y 90% aproximadamente, entre 15% y 85% aproximadamente, entre 20 % y 80% aproximadamente, entre 25% y 75% aproximadamente, entre 30% y 70% aproximadamente, entre 40% y 60% aproximadamente, o 50%
20 aproximadamente por peso del ingrediente activo. Las composiciones de la invención son particularmente útiles para ingredientes activos que se suministran en dosis de 0.001 mg/día a 100 mg/día, preferiblemente en dosis de 0.01 mg/día a 75 mg/día, y más preferiblemente en dosis de 0.10 mg/día a 50 mg/día. Es de entenderse que más de un ingrediente activo puede ser incorporado en las
25 formulaciones descritas en el presente documento y que el uso del término "ingrediente activo" de ninguna manera excluye el uso de dos o más de tales ingredientes activos.

Excipientes

 [00230] En algunas modalidades, la formulación en polvo seco
30 contiene un excipiente hidrófobo farmacéuticamente aceptable formador de

recubrimiento. Los excipientes formadores de recubrimiento son agentes activos de superficie que mejoran la dispersabilidad de los polvos pulverizados. El excipiente hidrófobo puede tomar varias formas que dependen, al menos en cierta medida de la composición y uso futuro de la formulación de polvo seco.

- 5 Excipientes hidrófobos adecuados farmacéuticamente aceptables pueden, en general, seleccionarse del grupo que consiste en fosfolípidos de cadenas largas, aminoácidos hidrófobos y péptidos, y jabones de ácidos grasos de cadena larga.

 [00231] En algunas modalidades, los excipientes formadores de recubrimiento incluyen: glicina, alanina, valina, trileucina, dileucina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), y estearato de magnesio. En algunas modalidades, las formulaciones de polvo seco descritas en el presente documento incluyen trileucina.

 [00232] Mediante el control de la formulación y el proceso, es posible que la superficie de las partículas pulverizadas se componga principalmente del excipiente de formación de recubrimiento. Las concentraciones de superficie pueden ser mayores del 70%, tal como mayores del 75% o 80% o 85%. En algunas modalidades, la superficie está compuesta de más del 90% de excipiente formador de recubrimiento, o más del 95% o 98% o 99% de excipiente hidrófobo.

15 Para ingredientes activos potentes, no es raro que la superficie se componga de más del 95% de excipiente formador de recubrimiento.

 [00233] En algunas modalidades, el excipiente formador de recubrimiento comprende más de 70% de la interfaz de partícula según se midió por Espectroscopia de Electrones para el Análisis Químico (ESCA, también conocido como espectroscopia de fotoelectrones de rayos X o XPS), preferiblemente mayor del 90% o 95%.

 [00234] En algunas modalidades, el excipiente formador de recubrimiento facilita el desarrollo de una morfología de partícula rugosa. Esto significa que la morfología de las partículas es porosa, arrugada, corrugada o plegada en vez de lisa. Esto significa que la superficie interior y/o exterior de las partículas del medicamento inhalable es al menos rugosa en parte. Esta rugosidad es útil para proporcionar una alta eficiencia de administración,

30

consistencia de dosis y direccionamiento del fármaco mediante una mejora de la fluidización y dispersabilidad del polvo. Los aumentos en la rugosidad de las partículas resultan en disminuciones en las fuerzas de cohesión inter-partículas como resultado de la inhabilidad de las partículas para establecer un contacto
5 tipo van der Waals Las disminuciones en las fuerzas de cohesión son suficientes para mejorar dramáticamente la fluidificación y dispersión de polvo en conjuntos de partículas rugosas.

[00235] Si está presente, el contenido del excipiente formador de recubrimiento generalmente varía de 15 a 50% peso/peso aproximadamente del medicamento. Para trileucina, se requiere un mínimo de 15% aproximadamente
10 en la formulación para proporcionar un rendimiento aceptable como un formador de recubrimiento. Para leucina, el contenido mínimo requerido es mayor, 30% aproximadamente.

[00236] El uso de excipientes formadores de recubrimiento tales como trileucina puede estar limitado por su solubilidad en la materia prima que es líquida. Típicamente, el contenido de trileucina en un polvo modificado es menor de 30% por peso, más a menudo en el orden de 10% por peso a 20% por peso (10-30 por peso aproximadamente). Debido a su solubilidad limitada en agua y su actividad superficial, la trileucina es un excelente formador del
15 recubrimiento. La leucina también puede utilizarse como un excipiente de formación de recubrimientos y las modalidades de la invención pueden comprender partículas que comprenden concentraciones de leucina de 50% a 75% aproximadamente.

[00237] Los jabones de ácidos grasos se comportan de manera similar a la leucina y trileucina y por tanto son modificadores de superficie adecuados.
25

[00238] Debido a la corta escala de tiempo del evento de secado, los ingredientes activos que se disuelven en la materia prima generalmente estarán presentes como sólidos amorfos en el fármaco pulverizado.

[00239] La movilidad molecular de un sólido amorfo es significativa cuando se compara con la de su homólogo cristalino. La movilidad molecular comprende movimientos de largo alcance relacionados con la difusión molecular
30

así como movimientos locales, tales como rotaciones de enlaces. El principio fundamental en estabilización de estado sólido de materiales amorfos es que la movilidad molecular conduce a cambios físicos y químicos indeseables. Por lo tanto, las estrategias de formulación para materiales amorfos normalmente se centran en la supresión de la movilidad molecular.

[00240] La existencia de una relación entre la movilidad molecular e inestabilidad es intuitiva y bien conocida. Sin embargo, para ser útil, la movilidad molecular debe ser cuidadosamente definida y entendida en términos de los tipos de movimientos presentes. Los movimientos moleculares de largo alcance se originan de la relajación estructural, conocida como relajación- α . La escala de tiempo para tales movimientos aumenta notablemente a medida que la temperatura disminuye por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g), o por el contrario, a medida que la T_g se eleva a una temperatura de observación fija. Debido a la estabilización de una molécula en un cristal limita su movilidad molecular de largo alcance, se ha convertido en la estrategia de formulación más común para estabilización de estado sólido de fármacos amorfos.

[00241] El control de estabilización vítrea de la movilidad molecular en el estado sólido, tal como a través del uso de agentes formadores de la matriz, puede mejorar la estabilidad fisicoquímica de la proteína en la formulación. Cuando se necesita un agente formador de la matriz, múltiples consideraciones regirán su selección. La función principal de un excipiente formador de la matriz es reducir la movilidad molecular global de largo alcance del fármaco. En la práctica, esto se logra mediante el aumento de la temperatura de transición vítrea de la fase amorfa que contiene el fármaco. Mientras los excipientes con altos valores T_g son generalmente deseables, incluso un excipiente con una T_g moderada podría ser adecuado para algunas formulaciones (por ejemplo, fármacos con una T_g moderada o si la concentración de fármaco en la formulación es baja). Para guiar al formulador, vale la pena destacar las propiedades de un formador de la matriz ideal: un material biocompatible con alta temperatura de transición vítrea que es miscible con el fármaco, formando una única fase amorfa que es sólo débilmente plastificada por el agua.

[00242] En algunas modalidades, las formulaciones en polvo seco contienen un excipiente formador de la matriz. Los excipientes formadores de la matriz que suprimen la movilidad molecular de largo alcance incluyen hidratos de carbono, aminoácidos, y agentes tampón. En algunas modalidades, los excipientes formadores de la matriz incluyen: histidina, HCl histidina, sacarosa, trehalosa, manitol y citrato de sodio. Así, algunos excipientes, tales como histidina, se pueden conocer como un agente tampón o un excipiente formador de la matriz de manera intercambiable. En algunas modalidades, las formulaciones en polvo seco descritas en este documento, por ejemplo, las formulaciones de núcleo recubierto, incluyen trehalosa.

[00243] La importancia de otros tipos de movimientos moleculares se ha vuelto cada vez más reconocida en la literatura farmacéutica. La nomenclatura (α , β , Etc.) que se utiliza para designar los tipos de movimientos moleculares se origina a partir de espectroscopía dieléctrica de banda ancha. Los espectros de relajación dieléctrica se representan convencionalmente en una escala de frecuencia. Cuando se interpretan estos espectros, los picos de pérdida dieléctrica a las frecuencias más bajas son designados como movimientos α , los movimientos de mayor frecuencia como movimientos β , luego γ , y así sucesivamente. Así, β y otros movimientos que se producen a altas frecuencias se conocen como movimientos "rápidos" o secundarios (y, en algunos casos, relajaciones de Johari-Goldstein). Aunque estas relajaciones secundarias a menudo se atribuyen a movimientos intramoleculares de diferentes fracciones moleculares (por ejemplo, cadenas laterales en una proteína), existen incluso para moléculas rígidas. En una representación física simplista, los movimientos β se describen a veces como "movimientos de jaula" aleatorios de especies atrapadas entre sus vecinos más cercanos. En algún momento, los movimientos locales de los vecinos más cercanos proporcionan suficiente volumen libre para permitir un salto de difusión de las especies atrapadas. Este es un movimiento α . Por lo tanto, los movimientos β conducen a movimientos alfa.

[00244] Los movimientos secundarios son un área de investigación activa desde las perspectivas teóricas como prácticas. Y, aunque gran parte de

la literatura implica cristales liofilizados o apagados por fusión, los principios son también relevantes para partículas amorfas modificadas para inhalación (por ejemplo, polvos fabricados utilizando procesos de pulverización o ciertos procesos ascendentes). La cristalización de moléculas pequeñas cerca de T_g se sospecha se elevada a partir de movimientos α . Los formuladores de proteínas han reconocido la importancia de controlar estos movimientos α . La supresión de los movimientos α en formulaciones amorfas se hace típicamente con excipientes orgánicos pequeños, tales como glicerol, manitol, sorbitol, y dimetilsulfóxido. Aunque estos son los excipientes que se reportan con más frecuencia para suprimir los movimientos α , otras moléculas orgánicas de bajo PM podrían servir para este propósito (por ejemplo, sales de tampones o contraiones). Se teoriza que estos excipientes suprimen los movimientos de dominios de alta movilidad al aumentar la viscosidad local. Para el lector familiarizado con la amplia literatura sobre estabilización vítrea, el uso de tales excipientes puede parecer contra intuitivo. Estos y la mayoría de otros materiales de bajo peso molecular tienen bajos valores de T_g y reducirán la T_g de una formulación, un fenómeno conocido como plastificación. Sin embargo, estos excipientes también pueden disminuir los movimientos α . Por lo tanto, se conocen como antiplastificantes o, a veces como plastificantes, dependiendo del punto de referencia; mientras plastifican los movimientos α , anti-plastifican los movimientos β . Se debe tener en cuenta que esta terminología es una fuente potencial de confusión en la literatura; la designación de un material como un plastificante o un antiplastificante depende de si el punto de referencia de alguien es los movimientos α o los movimientos secundarios.

[00245] Debido a que la estabilización del estado sólido de las proteínas requiere la formulación de una matriz vítrea, las contribuciones de los movimientos α y β son de particular interés. A pesar de que la literatura tiene numerosas referencias para utilizar los agentes formadores de la matriz para estabilizar las proteínas, hasta hace poco, han habido pocas referencias específicas a la influencia de estos agentes sobre movimientos locales. Aunque las temperaturas de transición vítrea de proteínas son difíciles de medir, la mayoría de los datos sugieren que $T_g > 150^\circ\text{C}$. Por lo tanto, los excipientes (ej.,

disacáridos tales como sacarosa o trehalosa) más comúnmente utilizados para estabilizar las proteínas también plastificarán los movimientos □ en la proteína (y antiplastificarán movimientos secundarios). Trabajos recientes han demostrado que □ movimientos gobiernan en gran medida la estabilidad de las

5 proteínas en los cristales de azúcar. Por lo tanto, disacáridos antiplasticize □ movimientos en las formulaciones de proteínas.

[00246] En algunas modalidades, las formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento comprenden excipientes formadores de la matriz con una temperatura de transición vítrea elevada ($> 80^{\circ}\text{C}$). En algunas

10 modalidades, las formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento comprenden agentes formadores de la matriz tales como sacarosa, trehalosa, manitol, dicetopiperazina de fumarilo, y citrato de sodio.

[00247] La mezclas de agentes formadores de la matriz pueden utilizarse para lograr la estabilización óptima del sólido amorfo. Para las

15 formulaciones "plataforma" de núcleo recubierto se utilizan mezclas de trehalosa y manitol en algunas modalidades.

[00248] La cantidad de formador de la matriz necesario para lograr suprimir la movilidad molecular y lograr la estabilidad física y química dependerá de la naturaleza del agente activo. Para algunas modalidades con proteínas

20 pulverizadas, la relación molar de formador de la matriz a proteína puede estar en el rango de 300 a 900. Para moléculas pequeñas, la cantidad requerida de formador de la matriz dependerá de la Tg del agente activo.

[00249] En algunas modalidades, las formulaciones en polvo seco descritas en la presente contienen un agente tampón. Los buffers son bien

25 conocidos para el control de pH, tanto como un medio para suministrar un fármaco a un pH fisiológicamente compatible (es decir, para mejorar la tolerancia), así como para proporcionar condiciones de solución favorable para la estabilidad química de un fármaco. En algunas formulaciones y procesos descritos en la presente, el medio de pH de un fármaco puede ser controlado por

30 la co-formulación del fármaco y el agente tampón juntos en la misma partícula.

[00250] Mientras que es natural cuestionar el significado de pH en un producto de fármaco en estado sólido, un número de estudios han

demostrado la importancia del control de pH para la estabilidad química en estado sólido. El agua es ubicuo, incluso en formulaciones en polvo "seco" en el estado sólido. Además de su papel como un plastificante de materiales amorfos, el agua es un reactivo, un producto de degradación, y también puede servir como un medio para la disolución y reacciones químicas. Existe evidencia de que la adsorción de agua sobre superficies de partículas puede resultar en una solución saturada dentro de la película superficial. De hecho, algunos estudios han utilizado el pH de una suspensión del fármaco (es decir, una solución saturada) como un indicador del pH local o "microambiental" del fármaco disuelto en la película superficial en un polvo "seco". El pH microambiental ha demostrado, en algunos casos, ser relevante para la estabilidad del fármaco.

[00251] Al igual que con un fármaco, los excipientes también se disuelven en la película de la superficie de agua adsorbida para formar una solución saturada. Esto puede utilizarse como ventaja del formulador para permitir el control del pH local en la capa adsorbida de humedad. Los buffers o modificadores de pH, tales como histidina o fosfato, se usan comúnmente en formulaciones liofilizadas o pulverizadas para controlar la degradación química de solución y de estado sólido de las proteínas.

[00252] En algunas modalidades los buffers para la formulación incluyen: histidina, glicina, acetato y fosfato.

[00253] Excipientes opcionales incluyen sales (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de calcio, citrato de sodio), antioxidantes (por ejemplo, metionina), excipientes para reducir la agregación de proteínas en solución (por ejemplo, arginina), agentes de enmascaramiento del sabor, y agentes diseñados para mejorar la absorción de macromoléculas en la circulación sistémica (ej., fumaril dicetopiperazina).

Formulación

[00254] Se proporcionan en la presente formulaciones de polvo seco que comprende partículas pulverizadas que omiten eficazmente la deposición en la orofaringe de un sujeto adulto promedio, lo que permite la administración dirigida de medicamento en los pulmones.

[00255] En algunas modalidades, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en el presente documento tienen una dosis pulmonar total in vitro (TLD) de entre 80 y 95% peso/peso de la dosis nominal, por ejemplo entre 85 y 90% peso/peso para un adulto promedio.

5 [00256] En algunas modalidades, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en el presente documento tienen una dosis pulmonar total in vitro (TLD) de entre 90 y 100% peso/peso de la dosis administrada, por ejemplo entre 90 y 95% peso/peso para un adulto promedio.

[00257] En algunas modalidades, las formulaciones en polvo seco
10 descritas en el presente documento comprenden la dosis administrada adecuadamente que tiene un parámetro de inercia de entre 120 y 400 μm^2 L/min, por ejemplo entre 150 y 300 μm^2 L/min.

[00258] En algunas modalidades, las formulaciones en polvo seco
15 descritas en el presente documento comprenden partículas modificadas que comprenden una superficie porosa, corrugada, o rugosa. Tales partículas exhiben fuerzas de cohesión reducidas entre partículas en comparación con cristales de fármaco micronizados de un tamaño de partícula primaria comparable. Esto conduce a mejoras en la fluidización y dispersabilidad del polvo con relación a las mezclas ordenadas de fármaco micronizado y lactosa gruesa.

20 [00259] En algunas modalidades las partículas de las formulaciones en polvo seco como se describe en la presente tienen una rugosidad mayor de 1.5, por ejemplo de 1.5 a 20, 3 a 15, o de 5 a 10.

[00260] Para algunos ingredientes farmacéuticos activos, por
25 ejemplo, muchos péptidos o proteínas (por ejemplo, Fab anti-TSLP), una superficie rugosa puede lograrse a través de pulverización del fármaco puro. En tal caso, la formulación puede comprender fármaco puro, es decir 100% peso/peso de agente activo o fármaco.

[00261] En algunas modalidades, las formulaciones en polvo seco
30 descritas en el presente documento comprenden fármaco y agente tampón. La formulación puede comprender 70% a 99% peso/peso de fármaco o agente activo, y el resto es agente tampón.

- [00262] En algunas modalidades, las formulaciones descritas en el presente documento pueden comprender de 0.1 a 99% peso/peso de agente activo, o de 0.1 a 70% peso/peso de agente activo, o de 0.1 a 50% peso/peso de ingrediente(s) activo(s), o 0.1% a 30% peso/peso de ingrediente(s) activo(s).
- 5 [00263] En algunas modalidades, la formulación de polvo seco descritas en el presente documento pueden incluir excipientes para mejorar aún más la estabilidad o biocompatibilidad de la formulación. Por ejemplo, se contemplan diversas sales, buffers, excipientes formadores de recubrimiento, y excipientes formadores de la matriz.
- 10 [00264] En algunas modalidades, las partículas de las formulaciones en polvo seco descritas en este documento tienen un tamaño geométrico, expresado como un diámetro medio de masa (x50) de entre 0.8 y 2.0 μm , por ejemplo de entre 1.0 y 1.5 μm .
- [00265] En algunas modalidades, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en este documento tienen un tamaño geométrico, expresado como x90 de entre 2.0 μm y 4.0 μm , por ejemplo entre 2.5 μm y 3.5 μm .
- 15 [00266] En algunas modalidades, las partículas de las formulaciones en polvo seco descritas en el presente documento tienen una densidad al compactar ($\rho_{\text{al compactar}}$) de entre 0.03 y 0.40 g/cm³, por ejemplo de entre 0.07 y 0.30 g/cm³.
- [00267] En algunas modalidades, las partículas primarias de la formulación de polvo seco descritas en la presente tienen un tamaño aerodinámico medio calculado (D_a) de entre 0.1 y 1.0 μm , por ejemplo entre 0.5 y 0.8 μm .
- 25 [00268] En algunas modalidades, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en este documento tienen un diámetro aerodinámico calculado de entre 0.5 y 1.2 μm , por ejemplo de entre 0.8 y 1.0 μm .
- 30 [00269] En algunas modalidades, el conjunto de partículas de las formulaciones en polvo seco descritas en este documento en la dosis

administrada adecuadamente tienen un diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) de entre 1.0 y 3.0 μ m, por ejemplo de entre 1.5 y 2.0 μ m

[00270] En algunas modalidades, la formulación de la presente divulgación contiene partículas que comprenden un recubrimiento y un núcleo:
5 trileucina como un formador de recubrimiento presente en la superficie de la partícula, y un núcleo que comprende el ingrediente activo (por ejemplo, Fab anti-TSLP), trehalosa, o trehalosa y manitol en combinación, y un agente tampón.

[00271] En algunas modalidades, la invención proporciona una
10 formulación que comprende molécula de unión a TSLP al 40% (peso/peso) aproximadamente, por ejemplo, Fab1 anti-TSLP, trileucina al 25% (peso/peso) aproximadamente, trehalosa y manitol combinado al 30% (peso/peso) , y histidina al 5% (peso/peso) aproximadamente. En otras modalidades, la presente solicitud proporciona una formulación que comprende molécula de
15 unión a TSLP al 50% (peso/peso) aproximadamente, trileucina al 15% (peso/peso) aproximadamente, HCl al 2.6% (peso/peso) aproximadamente, histidina al 5.6% (peso/peso) aproximadamente, y trehalosa y una base combinada al 26.8% (peso/peso) aproximadamente o molécula de unión a TSLP al 50% (peso/peso) aproximadamente, trileucina al 15% (peso/peso) , trehalosa
20 al 19.4% (peso/peso) aproximadamente, histidina al 13% (peso/peso) aproximadamente, y HCl al 2.6% (peso/peso) aproximadamente.

[00272] En modalidades adicionales, la presente solicitud describe una composición farmacéutico en polvo libre de vehículo que comprende partículas liberables desde un inhalador de polvo seco, que comprende las
25 moléculas anti-TSLP descritas en este documento, en donde una dosis pulmonar total in vitro es mayor que el 90% de la dosis administrada, y en donde las partículas en la dosis suministrada tienen un parámetro de inercia entre 120 y 400 micras² L/min.

[00273] En otra modalidad, la presente solicitud divulga una
30 composición farmacéutico libre de vehículo liberable desde de un inhalador de polvo seco, la composición que comprende una pluralidad de partículas, que comprende un núcleo que comprende una molécula de anti-TSLP como se

describe en el presente documento y al menos un excipiente formador de la matriz, y un recubrimiento que comprende un excipiente hidrófobo y un agente tampón; y en donde la dosis pulmonar total in vitro es mayor que el 90% peso/peso de la dosis suministrada. En algunas modalidades, las partículas se
5 forman mediante pulverización. En otra modalidad, el excipiente hidrófobo comprende trileucina.

[00274] En una modalidad adicional, la presente solicitud divulga una composición farmacéutica libre de vehículo que comprende una pluralidad de partículas primarias y aglomerados de partículas liberables desde un
10 inhalador de polvo seco, la composición que comprende una molécula de anti-TSLP como se describe en el presente documento, y en donde una dosis pulmonar total in vitro (TLD) es mayor que el 80% de la dosis nominal, y en donde las partículas primarias se caracterizan por: una morfología corrugada; un diámetro aerodinámico medio (Da) entre 0.3 y 1.0 μm ; y en donde las partículas
15 y aglomerados de partículas liberables desde un inhalador de polvo seco tienen un diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) entre 1.5 y 3.0 μm . En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende además un receptáculo para contener las partículas primarias, el receptáculo adecuado para contener las partículas antes de su aerosolización dentro de un inhalador de
20 polvo seco, y en donde el aerosol que comprende aglomerados respirables se forma tras dicha aerosolización.

[00275] En una modalidad adicional, la presente solicitud divulga una formulación de polvo farmacéutico para administración pulmonar, el polvo que comprende partículas que comprenden: 1 a 100% por peso de una molécula
25 de anti-TSLP como se describe en el presente documento, en donde el polvo se caracteriza por una distribución de tamaño de partícula de al menos 50% entre 1 a 1.5 micras, o una densidad de polvo 0.05 a 0.3 g/cm^3 , un diámetro aerodinámico de menos de 2 micras, una rugosidad de 1.5 a 20; y en donde el polvo se administra por inhalación, y proporciona una dosis pulmonar total in vitro
30 de más del 80%. En algunas modalidades, la formulación de polvo farmacéutico está libre de vehículo. En otras modalidades, el polvo se empaca en un recipiente para su uso con un inhalador de polvo seco, y en donde cuando se

aeroliza utilizando dicho inhalador de polvo seco, el polvo se caracteriza por aglomerados respirables que tienen un diámetro aerodinámico de masa media de menos de 2 micras aproximadamente.

Proceso

5 [00276] Se proporciona también en este documento un proceso para la preparación de formulaciones en polvo seco para inhalación que comprende partículas pulverizadas, la formulación que contiene al menos un ingrediente activo, y que tiene una dosis pulmonar total in vitro (TLD) de entre 80 y 95% peso/peso, por ejemplo entre 85 y 90% peso/peso de la dosis nominal para un
10 adulto promedio.

 [00277] Se proporciona también en este documento unos procesos para la preparación de formulaciones en polvo seco para inhalación que comprende partículas pulverizadas, la formulación que contiene al menos un ingrediente activo, y que tiene una dosis pulmonar total in vitro (TLD) de entre
15 90 y 100% peso/peso, por ejemplo entre 90 y 95% peso/peso de la dosis administrada para un adulto promedio.

 [00278] En algunas modalidades, las formulaciones de polvo seco contienen al menos un ingrediente activo que es adecuado para tratar enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias,
20 particularmente asma y/o COPD, por ejemplo, Fabs anti-TSLP. En algunas modalidades, las formulaciones de polvo seco contienen al menos un ingrediente activo que es adecuado para tratar enfermedades de manera no invasiva en la circulación sistémica.

 [00279] La pulverización confiere ventajas en la producción de
25 partículas modificadas para inhalación tales como la capacidad para producir rápidamente un polvo seco y el control de los atributos de las partículas incluyendo tamaño, morfología, densidad y composición de superficie. El proceso de secado es muy rápido (en el orden de milisegundos). Como resultado los ingredientes más activos que se disuelven en la fase líquida se precipitan
30 como sólidos amorfos, ya que no tienen tiempo suficiente para cristalizarse.

[00280] La pulverización comprende cuatro operaciones unitarias: preparación de materias primas, la atomización de la materia prima para producir gotas de tamaño micrométrico, secado de las gotas en un gas caliente, y la recolección de las partículas secas con un separador de ciclón o de bolsa
5 interna.

[00281] En algunas modalidades, los procesos para la preparación de partículas de polvo seco comprenden tres pasos, sin embargo en algunas modalidades dos o incluso todos los tres pasos pueden llevarse a cabo sustancialmente de forma simultánea, por lo que en la práctica el proceso puede
10 de hecho ser considerado como un proceso de una única etapa. Únicamente para efectos de describir el proceso de la presente invención, los tres pasos se describirán por separado, pero dicha descripción no pretende limitar a un proceso de tres pasos.

[00282] En algunas modalidades, el proceso incluye preparar una
15 materia prima de la solución y pulverizar la materia prima para proporcionar partículas activas de polvo seco. La materia prima comprende al menos un ingrediente activo disuelto en una materia prima que es líquida de base acuosa. En algunas modalidades, la materia prima comprende al menos un ingrediente activo (ej., Fab1anti-TSLP) disuelto en una materia prima de base acuosa que
20 comprende un co-disolvente agregado. En algunas modalidades, la materia prima comprende al menos un agente activo disuelto en una materia prima de etanol/agua, en donde la fracción de etanol está entre 5% y 30% peso/peso, por ejemplo entre 5% y 20% peso/peso.

[00283] Para los sólidos amorfos, es importante controlar el
25 contenido de humedad del fármaco. Para los fármacos que no son hidratos el contenido de humedad en el polvo es preferiblemente menor que 5%, más típicamente menos de 3%, o incluso 2% por peso. El contenido de humedad debe ser lo suficientemente alto, sin embargo, para asegurar que el polvo no exhiba fuerzas de atracción electrostáticas significativas. El contenido de
30 humedad en los polvos pulverizados puede determinarse por volumetría de Karl Fischer.

[00284] En algunas modalidades, la materia prima se pulveriza en una corriente de aire caliente filtrado que evapora el disolvente y transporta el producto seco a un colector. Luego el aire gastado es expulsado con el disolvente. Las condiciones de funcionamiento del pulverizador, tales como

5 temperatura de entrada y de salida, tasa de alimentación, presión de atomización, tasa de flujo del aire de secado, y la configuración de la boquilla se pueden ajustar con el fin de producir el tamaño de partícula requerido, contenido de humedad, y rendimiento de producción de las partículas secas resultantes. La selección del aparato apropiado y condiciones de procesamiento están dentro

10 del ámbito de un experto en vista de las enseñanzas del presente documento y puede llevarse a cabo sin experimentación indebida. Configuraciones de ejemplo para un secador en escala NIRO® PSD-1® son las siguientes: temperatura de entrada de aire entre 80° C y 200° C aproximadamente, tal como entre 110° C y 170° C; una salida de aire entre 40° C y 120° C aproximadamente tal como 60°

15 C y 100° C; una tasa de suministro de líquido entre 30 g/min y 120 g/min aproximadamente, tal como 50 g/min a 100 g/min aproximadamente; flujo total de aire de 140 pies cúbicos estándar por minuto (scfm) a 230 scfm aproximadamente, tal como 160 scfm a 210 scfm aproximadamente; y una tasa de flujo de aire de atomización entre 30 scfm y 90 scfm aproximadamente, tal

20 como 40 scfm a 80 scfm aproximadamente. El contenido de sólidos en la materia prima pulverizada estará típicamente en el intervalo de 0.5% peso/volumen (5 mg/ml) a 10% peso/volumen (100 mg/ml), tal como 1.0% peso/volumen a 5.0% peso/volumen. Los ajustes, por supuesto, varían dependiendo de la escala y el tipo de equipo utilizado, y la naturaleza del sistema disolvente empleado. En

25 cualquier caso, el uso de estos y métodos similares permiten la formación de partículas con diámetros apropiados para la deposición de aerosol en el pulmón.

[00285] En algunas modalidades, los excipientes todos se disuelven en la materia prima, y los recubrimientos nucleo-recubrimiento en el ingrediente activo dispersado son promovidos por las diferencias en las

30 propiedades físicas de los solutos disueltos.

[00286] Como se discutió anteriormente para las partículas que comprenden un ingrediente activo amorfo, la naturaleza de la superficie de

partícula y morfología serán controladas mediante el control de la solubilidad y difusividad de los componentes dentro de la materia prima. Excipientes hidrófobos activos superficiales (ej., trileucina, fosfolípidos, jabones de ácidos grasos) se pueden concentrar en la interfaz, mejorando la fluidificación de polvo y capacidad de dispersión, mientras que también se aumenta la rugosidad en la superficie de las partículas.

[00287] Cualquier paso de pulverización y/o todos los pasos de pulverización pueden llevarse a cabo utilizando equipo convencional usado para preparar partículas pulverizadas para su uso en productos farmacéuticos que se administran por inhalación. Pulverizadores comercialmente disponibles incluyen los fabricados por Büchi Ltd. y Niro Corp.

[00288] En algunas modalidades, la materia prima se atomiza con una boquilla de doble flujo. El ensanchamiento significativo de la distribución de tamaño de partícula de las gotas de líquido ocurre sobre sólidos con una carga aproximada de 1.5% p/p. Las gotas de mayor tamaño en la cola de la distribución resultan en partículas más grandes en la correspondiente distribución de polvo. Como resultado, algunas modalidades con boquillas de doble flujo restringen la carga de sólidos a 1.5% peso/peso o menos, tal como 1.0% peso/peso, o 0.75% peso/peso.

[00289] En algunas modalidades, distribuciones estrechas de tamaño de gotas pueden lograrse con pulverizadores de película plana como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nos. 7.967.221 y 8,616,464 en cargas altas de sólidos. En algunas modalidades, la materia prima se pulveriza en cargas de sólidos entre 2% y 10% peso/peso, tales como 3% y 5% peso/peso.

[00290] En algunas modalidades, la densidad de población de partículas o PPD esta entre 0.01×10^{-6} y 1.0×10^{-6} , tal como entre 0.03×10^{-6} y 0.2×10^{-6} .

[00291] En algunas modalidades, la proporción EtOH/sólidos está entre 1,0 y 20,0, tal como entre 3,0 y 10,0.

[00292] En algunas modalidades, la presente solicitud divulga una formulación farmacéutico en polvo para inhalación que comprende partículas hechas por un procedimiento que comprende:

- 5 a. preparar una solución de las moléculas de unión anti-TSLP descritos en este documento en una mezcla de agua/etanol, en donde el etanol está presente entre 1 y 20% y una relación de etanol a sólidos totales estan entre 1 y 20;
- 10 b. pulverizar la solución para obtener particulados, en donde los particulados se caracterizan por una densidad de partículas de un diámetro geométrico 0.2 g/cm³ o menor, de 1-3 micras y un diámetro aerodinámico de 1 a 2 micras;

y en donde el polvo, cuando se administra por inhalación, proporciona una dosis pulmonar total in vitro mayor del 80%. aproximadamente. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica en polvo incluye además un excipiente formador de la matriz. En algunas modalidades, el excipiente formador de la matriz comprende una alfa. En otras modalidades, el excipiente formador de la matriz comprende un beta. En una modalidad adicional, el excipiente formador de la matriz comprende trehalosa.

[00293] En algunas modalidades de la formulación farmacéutico en polvo, la densidad de la población de partículas esta entre 0.01×10^{-6} y 1.0×10^{-6} .

[00294] La presente solicitud también divulga un método de administración de partículas que comprenden un polvo seco a los pulmones de un sujeto, el método que comprende:

- 25 a. preparar una solución de las moléculas de unión anti-TSLP descritas en este documento en una mezcla de agua/etanol, en donde el etanol está presente entre 5 y 20%,
- b. pulverizar la solución para obtener particulados, en donde los particulados se caracterizan por una densidad de partícula de entre 0.05

y 0.3 g/cm³ aproximadamente, un diámetro geométrico de 1-3 micras y un diámetro aerodinámico de 1-2 micras;

c. empaquetar el polvo pulverizado en un recipiente;

5 d. proporcionar un inhalador que tenga un medio para extraer el polvo para el recipiente, el inhalador que tenga además un medio fluidización y aerosolización de polvo, el inhalador operable en un esfuerzo inspiratorio del paciente de entre 2 y 6 kPa aproximadamente; el inhalador y el polvo
10 juntos que proporcionan un parámetro de inercia de entre 120 y 400 μm^2 L/min aproximadamente y en donde el polvo cuando se administre por inhalación, proporcione al menos 90% de deposición pulmonar.

[00295] La presente solicitud también divulga un método de preparación de una formulación de medicamento en polvo seco para la administración pulmonar, el método que comprende

15 a. preparar una solución de las moléculas de unión anti-TSLP descritas en este documento en una mezcla de agua/etanol, en donde el etanol está presente entre 5 y 20%,

b. pulverizar la solución para obtener particulados, en donde los particulados se caracterizan por una densidad de partícula de entre 0.05 y 0.3 aproximadamente, un diámetro geométrico de 1-3 micras y un
20 diámetro aerodinámico de 1-2 micras.

[00296] En una modalidad adicional, la presente solicitud divulga una composición farmacéutica en polvo liberable desde un inhalador de polvo seco, que comprende partículas que comprenden las moléculas de unión anti-TSLP descritas en el presente documento, en donde la dosis pulmonar total in
25 vitro total es mayor del 90% peso/peso de la dosis administrada, y en donde la composición comprende al menos una característica de estar libre de vehículo, una densidad de partícula de 0.05 a 0.3 g/cm³; una rugosidad de partículas de 3 a 20; partículas hechas por un procedimiento que comprende pulverizar una

mezcla de etanol: agua; y partículas hechas por un procedimiento que comprende pulverizar una mezcla de etanol: agua que tiene una relación de etanol:sólidos de entre 1 y 20. En algunas modalidades, la composición farmacéutica en polvo comprende al menos dos de las características; en otras
5 modalidades, la composición farmacéutica en polvo comprende al menos tres de las características.

Dosificación

[00297] La dosificación, toxicidad y eficacia terapéutica de las moléculas anti-TSLP descritas en este documento, incluyendo composiciones
10 farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-TSLP o fragmentos de los mismos, pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales de experimento, por ejemplo, para determinar la LD50 (dosis letal al 50% de la población) y la ED50 (dosis terapéuticamente eficaz al 50% de la población). La relación de dosis entre los
15 efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD50/ED50. Se desean compuestos que presenten índices terapéuticos elevados. Mientras se pueden usar compuestos que presenten efectos tóxicos secundarios, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado con el fin
20 de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

[00298] Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios con animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de tales compuestos reside
25 preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a
30 partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración plasmática circulante que

incluye la IC50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición máxima media de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Tal información puede ser utilizada para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

Kits

[00299] También se proporcionan en este documento kits que incluyen una o más de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento, un dispositivo para administrar la composición farmacéutica a un sujeto, y las instrucciones para su uso. En algunas modalidades, el dispositivo puede administrar la composición farmacéutica en una forma de aerosol. En algunas modalidades, el dispositivo es un inhalador, por ejemplo, un inhalador de polvo seco (DPI). En otras modalidades, el dispositivo puede ser un inhalador de dosis medida o un nebulizador.

[00300] Inhaladores de polvo seco adecuados incluyen inhaladores de dosis unitaria, donde el polvo seco se almacena en una cápsula o blister, y el paciente carga una o más de las cápsulas o ampollas en el dispositivo antes de su uso. De forma alternativa, se contemplan inhaladores de polvo seco de dosis múltiples donde la dosis es pre-empacada en blisters con lámina de aluminio, por ejemplo en un cartucho, una tira o una rueda.

[00301] Inhaladores de polvo seco incluyen inhaladores de polvo seco de dosis múltiples tales como DISKUS™ (GSK, que se describe en la Patente EE.UU. 6.536.427), DISKHALER™ (GSK, que se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente WO 97/25086), GEMINI™ (GSK, que se describe en la Publicación de Solicitud de Patente WO 05/14089), GYROHALER™ (Vectura, que se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente WO 05/37353), y PROHALER™ (Valois, que se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente WO 03/77979).

[00302] Inhaladores de polvo seco de dosis única incluyen el AEROLIZER™ (Novartis, descrito en EE.UU. 3.991.761) y BREEZHALER™ (Novartis, descrito la patente EE.UU. 8.479.730 (Ziegler). Otros inhaladores de

dosis única adecuados incluyen los descritos en las patentes EE.UU. 8069851 y 7559325.

[00303] Inhaladores blister de dosis unitaria, que algunos pacientes encuentran más fáciles y más cómodos de usar para administrar medicamentos
5 que requieran administración de una vez al día, incluyen el inhalador descrito en la patente EE.UU. No. 8573197(Axford.).

[00304] En algunas modalidades, los inhaladores son inhaladores de polvo seco de múltiples dosis, donde la energía para fluidizar y dispersar el polvo se suministra por el paciente (es decir, MD-DPIs "pasivos"). Los polvos de
10 la presente invención se fluidizan y dispersan eficazmente a un bajo pico en la tasa del flujo inspiratorio (PIF). Como resultado, los pequeños cambios en la dispersión de polvo con PIF observados eficazmente equilibran los aumentos en la impactación inercial que se producen con aumentos en PIF, lo que lleva a deposición pulmonar independiente de tasa de flujo. La ausencia de la
15 dependencia de tasa de flujo observada para los polvos de la presente invención, promueve las reducciones en la variabilidad global entre pacientes.

[00305] Instrucciones de uso pueden incluir instrucciones para el diagnóstico o el tratamiento de condiciones inflamatorias relacionadas con TSLP. Se pueden utilizar kits como los proporcionados en este documento de acuerdo
20 con cualquiera de los métodos descritos en este documento. Los expertos en la técnica tendrán conocimiento de otros usos adecuados para los kits proporcionados en la presente, y serán capaces de emplear los kits para tales usos. Los kits tal y como se proporcionan en el presente documento también pueden incluir un gestor de correo (por ejemplo un sobre postal pagado o un
25 empaque de correspondencia) que se puede usar para devolver la muestra para su análisis, por ejemplo, a un laboratorio. El kit puede incluir uno o más recipientes para la muestra, o la muestra puede estar en un vial de recolección de sangre estándar. El kit también puede incluir uno o más entre un formulario de consentimiento, un formulario de solicitud de prueba e instrucciones sobre
30 cómo utilizar el kit en un método descrito en este documento. Los métodos para usar tales kits también están incluidos en este documento. Una o más de las

formas (por ejemplo, el formulario de solicitud de prueba) y el recipiente que contiene la muestra se pueden codificar, por ejemplo, con un código de barras para identificar el sujeto que proporcionó la muestra.

Métodos de Tratamiento

5 [00306] Se proporcionan en la presente métodos de tratamiento de una condición relacionada con TSLP en un sujeto en necesidad de tratamiento de los mismos, por ejemplo, un ser humano, mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las moléculas de unión de TSLP-descritos en este documento, o composiciones farmacéuticas de las
10 mismas. En algunas modalidades, tales métodos incluyen además la identificación y selección de un sujeto en necesidad de tratamiento de una afección inflamatoria relacionada con TSLP. La invención también proporciona el uso de las moléculas de unión a TSLP, como se describe en la presente, o composiciones farmacéuticas de las mismas, para tratar o prevenir la
15 enfermedad en un paciente. En algunas modalidades, la invención proporciona moléculas de unión a TSLP como se describe en la presente, o composiciones farmacéuticas de las mismas, para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedad en un paciente. En modalidades adicionales, la invención proporciona el uso de las moléculas de unión a TSLP como se describe en la
20 presente o composiciones farmacéuticas de las mismas, en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad en un paciente.

 [00307] En algunas modalidades, las enfermedades inflamatorias relacionadas con TSLP pueden ser provocadas por reacciones alérgicas o
25 irritantes o estimulantes ambientales. En algunas modalidades específicas, las enfermedades inflamatorias relacionadas con TSLP incluyen asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rinitis alérgica, rinosinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, esofagitis eosinofílica.

 [00308] En algunas modalidades, las moléculas de unión a TSLP, o
30 composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a TSLP se administran al sujeto mediante inhalación, por ejemplo, en una forma de aerosol por un inhalador de polvo seco. En otras modalidades, las moléculas de

unión a TSLP o composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante el uso de uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración seleccionadas incluyen rutas intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal. Alternativamente, las moléculas de unión a TSLP, o composiciones farmacéuticas comprenden las moléculas de unión a TSLP de la invención, se pueden administrar por vía no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual, o tópica.

[00309] En algunas modalidades, la condición inflamatoria relacionada con TSLP es asma. El asma es una enfermedad inflamatoria crónica compleja y heterogénea de las vías respiratorias que se caracteriza por la broncoconstricción reversible y está asociada con una respuesta exagerada de las vías respiratorias a una amplia gama de estímulos broncoconstrictores (hiperreactividad de las vías respiratorias; AHR). Un trabajo reciente se ha centrado en la identificación de las vías inmunes implicadas en la patogénesis del asma, y se han revelado los roles de las células T efectoras de tipo colaborador 2 (Th2) y no-Th2 (Lambrecht y Hammad, Nature immunology 2014, 16: 45-56). En el caso de asma alérgica, caracterizada por la inflamación eosinofílica y evidencia de atopia, los elementos de la vía inmune Th2 son cruciales en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación de vías respiratorias y AHR. La linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es un regulador aguas arriba clave de la respuesta Th2. TSLP se expresa en células epiteliales de la mucosa dentro de las vías respiratorias en respuesta a diversos estímulos (por ejemplo,

lesión física, materia particulada del ambiente, alergenitos, citoquinas pro-inflamatorias o de polarización de Th2, y productos microbianos). El papel de TSLP es modular las células dendríticas (DC) e inducir la diferenciación de células T vírgenes en células Th2 inflamatorias y promover la secreción de citoquinas a partir de mastocitos, eosinófilos y macrófagos como parte de la respuesta inmune innata. Además, TSLP puede interferir con el desarrollo de células T reguladoras que perjudican el balance entre tolerancia e inflamación. En el caso de asma no alérgica, caracterizada por inflamación neutrofílica o paucigranulocítica, las citoquinas que promueven la inflamación no son tan bien comprendidas, sin embargo las citocinas IL-17 no mediadas por Th2 e interferón- γ (IFN- γ) se cree que juegan un rol. Curiosamente, además de su papel en la mediación de la respuesta Th2, la evidencia preclínica sugiere que TSLP amplifica respuestas no Th2 y también puede ser importante en el establecimiento de inflamación crónica mediada por IL-17 e IFN- γ .

[00310] TSLP es tanto necesaria como suficiente para el desarrollo de la inflamación asociada a citoquinas Th2 de las vías respiratorias en los roedores. Los ratones transgénicos con secreción epitelial pulmonar constitutiva de TSLP bajo el control del promotor de la proteína C surfactante, desarrollan las siguientes funciones compatibles con asma: inflamación de las vías aéreas eosinofílicas; la expresión de Th2 a partir de la infiltración de células T CD4; eosinofilia sistémica; aumento de IgE; hiperreactividad de vías respiratorias; y remodelación significativa de vías respiratorias incluyendo hiperplasia de células caliciformes y fibrosis vascular y de vías respiratorias. Soporte adicional de la función de TSLP en la inflamación alérgica, expresión de TSLP y producción de proteínas también se encuentra que aumenta tras la exposición a alergenitos inhalados en el pulmón (Zhou et al., 2005, *Nature Immunology* 6, 1047-1053), mientras que la administración intranasal directa de TSLP en presencia del antígeno conduce a una rápida aparición de la enfermedad grave (Headley, 2009, *Journal of Immunology* 182, 1641-1647). Los ratones con deficiencia de TSLPR son resistentes al desarrollo de la inflamación similar a Th2 en el modelo clásico de evado de ovalbúmina-más-alumbre en ratones (Al-Shami, 2005, *The Journal of Experimental Medicine* 202, 829-839; Zhou y col ., 2005, *Nature*

Immunology 6, 1047-1053). La reducción de la inflamación de las vías respiratorias se correlacionó con una reducción de la IgE en suero y disminución de citocinas y quimiocinas Th2, tales como IL-4, -5, -13, eotaxina, y Quimiocina Regulada por Timo y Activación (TARC).

5 [00311] Se observó una mayor expresión de TSLP específicamente en la lámina propia de las vías respiratorias en pacientes con asma grave (Shikotra et al., 2012, Diario de Alergia e Inmunología Clínica 129, 104-111.e109). Por otra parte, varios estudios han demostrado una asociación entre la frecuencia de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el sitio de TSLP
10 humana y niveles de expresión de TSLP y susceptibilidad a la enfermedad para asma y esofagitis eosinofílica (Ferreira et al., 2014, El Diario de la alergia e inmunología clínica 133, 1564-1571; Harada, 2011, Diario Americano de Biología Celular y Molecular Respiratoria 44, 787-793; He 2009, El Diario de alergia e inmunología clínica 124, 222-229; Rothenberg, 2010, Nature Genetics 42, 289-
15 291). En un estudio reciente, también se encontraron variantes de genes de TSLP que se asocian con un aumento significativo en el riesgo de asma en asma infantil a través de asociaciones epistáticas (Biagini Myers et al., 2014, El Diario de Alergia e Inmunología Clínica 134, 891-899 e893) .

Terapias de Combinación

20 [00312] Los diversos tratamientos descritos anteriormente pueden combinarse con otros socios de tratamiento, tales como el actual estándar de atención para afecciones inflamatorias relacionadas con TSLP. Por consiguiente, los métodos de tratamiento de una condición inflamatoria relacionada con TSLP descritos en este documento pueden incluir además la
25 administración de un segundo agente al sujeto en necesidad de tratamiento. En algunas modalidades, el segundo agente puede seleccionarse a partir de, pero no se limita a, corticosteroides, broncodilatadores (SABA, LABA, SAMA, LAMA), antihistamínicos, antileucotrienos, e inhibidores de PDE-4.

 [00313] El término, "combinación" se refiere a cualquiera de una
30 combinación fija en una forma unitaria de dosificación, o una administración combinada en donde un compuesto de la presente invención y un socio de

combinación (por ejemplo, otro fármaco tal como se explica más adelante, también conocido como "agente terapéutico" o "co- agente ") se puede administrar de forma independiente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten

5 que los socios de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, efecto sinérgico. Los componentes individuales se pueden envasar en un kit o por separado. Uno o ambos de los componentes (por ejemplo, polvos o líquidos) se pueden reconstituir o diluir a una dosis deseada antes de la administración. Los términos "co- administración" o "administración combinada" o similares

10 como se utilizan en la presente pretenden abarcar la administración del socio de combinación seleccionado a un único sujeto que lo necesite (ej., un paciente), y pretenden incluir los regímenes de tratamiento en los que los agentes no son necesariamente administrados por la misma vía de administración o al mismo tiempo. El término "combinación farmacéutica" como se utiliza en la presente

15 significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un agente terapéutico e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los agentes terapéuticos. El término "combinación fija" significa que los agentes terapéuticos, por ejemplo, un compuesto de la presente invención y un socio de combinación, se administran ambos a un paciente de forma simultánea en la

20 forma de una sola entidad o dosificación. El término "combinación no fija" significa que los agentes terapéuticos, ej., un compuesto de la presente invención y un socio de combinación, se administran ambos a un paciente como entidades separadas ya sea simultáneamente, al mismo tiempo o secuencialmente sin límites de tiempo específicos, en donde dicha

25 administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los 2 compuestos en el cuerpo del paciente. El último también aplica a terapia de cocktail, por ejemplo, la administración de tres o más agentes terapéuticos. El término "combinación farmacéutica" como se usa en la presente se refiere a bien sea una combinación en una forma de dosificación unitaria, o una combinación

30 no fija o un kit de partes para la administración combinada donde dos o más agentes terapéuticos se pueden administrar de forma independiente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, sobre todo cuando estos

intervalos de tiempo permiten que los socios de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo sinérgico.

[00314] El término "terapia de combinación" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una condición o trastorno terapéutico descrito en la presente divulgación. Dicha administración abarca la co-administración de estos agentes terapéuticos en una manera sustancialmente simultánea, tal como en una sola cápsula que tiene una tasa fija de ingredientes activos. Alternativamente, dicha administración abarca la co-administración en recipientes múltiples, o separados (por ejemplo, tabletas, cápsulas, polvos y líquidos) para cada ingrediente activo. Los polvos y / o líquidos se pueden reconstituir o diluir a una dosis deseada antes de la administración. Además, tal administración también abarca el uso de cada tipo de agente terapéutico en una manera secuencial, bien sea al mismo tiempo aproximadamente o en tiempos diferentes. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos en el tratamiento de condiciones o trastornos descritos en la presente.

[00315] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por alguien de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente pueden ser utilizados en la práctica de la invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes, y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo las definiciones, servirá como control. Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Un experto en la técnica reconocerá que métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se podrían utilizar en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no es de ninguna manera limitada a los métodos y materiales descritos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-TSLP humanos y fragmentos Fab de los mismos utilizando presentación de fagos

5 [00316] Fabs que se unen específicamente a la isoforma TSLP humana 1 (SEQ ID NO: 27) se generaron utilizando la tecnología de presentación de fagos MorphoSys HuCAL PLATINUM®. La biblioteca de fagémidos se basa en el concepto HuCAL® (Knappik, (2000) J Mol 296: 57-86) y emplea la tecnología CysDisplay™ para la visualización del Fab en la superficie del fago (Lohning, WO 2001/05950).

10 ***Paneo***

[00317] Se realizaron tres tipos de paneo: Paneo de fase sólida contra TSLP humana recombinante directamente recubierta (rhTSLP), Paneo de captura de proteína precursora amiloide de fase sólida (APP), y Paneo de solución contra TSLP.

15 [00318] Para paneo de fase sólida contra rhTSLP directamente recubierta, la placas Maxisorp™ de 96 pozos se recubrieron con 300 µl de rhTSLP derivado de *E. coli* (R&D Systems) por pozo a 4° C durante la noche. Para cada paneo, aproximadamente 4×10^{13} anticuerpos de fagos de HuCAL PLATINUM® se añadieron a cada antígeno recubierto e incubado durante 2 h a
20 TA en un agitador de placas de microtitulación. Después, los fagos inespecíficos unidos se lavaron mediante varias etapas de lavado y los fagos unidos específicamente, se eluyeron usando DTT 25 mM en Tris/HCl 10 mM a un pH de 8. El eluato de DTT se transfirió a 14 ml de TG1 de *E. coli* y se incubó para ocasionar la infección por fagos.

25 [00319] Las bacteria infectadas se resuspendieron en medio 2xYT, se sembraron en placas de agar LB/Cam y se incubaron o/n. Las colonias se rasparon de las placas y se utilizaron para el rescate de fagos, amplificación policlonal de clones seleccionados, y la producción de fagos. Con fagos purificados se inició la siguiente ronda de paneo. La segunda y tercera ronda del
30 tamizaje en fase sólida se realizó de acuerdo al protocolo de la primera ronda a

excepción de las cantidades reducidas de antígeno y de unas condiciones de lavado más rigurosas.

[00320] En el Paneo de captura de APP de fase sólida contra TSLP Cyno, los antígenos utilizados en el panning tenían una etiqueta APP6 (amiloid precursor-proteína), y las proteínas de fusión antígeno-APP6 fueron capturadas a través de un anticuerpo anti-APP6 de ratón que es inmovilizado en una placa Maxisorp™. Para evitar la selección de la unión de fagos a la etiqueta APP6 del antígeno o al anticuerpo de captura anti-APP6, se llevó a cabo pre-bloqueo de fagos usando el anticuerpo de captura y un antígeno APP6-etiquetado irrelevante.

[00321] Las placas Maxisorp™ de 96 pozos se recubrieron con 300 µl de anticuerpo anti-APP y antígeno APP6 irrelevante marcado o/n a 4 °C. TSLP_Avi-APP6 humano de antígeno o TSLP_APP6-Avi cyno fueron capturados durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador. En paralelo, los fagos fueron pre-adsorbidos dos veces en anticuerpo anti-APP y antígeno irrelevante.

[00322] Además de los procedimientos de revestimiento de antígenos y bloqueo de fagos, el Paneo de captura se llevó a cabo como el Paneo de fase sólida descrito anteriormente.

[00323] Para paneo de solución contra TSLP, los fagos fueron bloqueadas con suero humano al 50%/quimibloqueador 0.33x/Tween 20 al 0.05%. Para cada grupo de fagos, se bloquearon 4 mg de perlas de Estreptavidina (Streptavidin M-280 Dynabeads®; Invitrogen) con Quimibloqueador 1x. Para la eliminación de los fagos de unión a estreptavidina o a perlas, se realizó dos veces la pre-adsorción de partículas de fagos bloqueadas utilizando perlas de estreptavidina bloqueadas cada vez. Luego se agregó TSLP_Avi-APP6 humano de antígeno biotinilado a las partículas de fagos. Después de la incubación, los complejos de antígeno-fagos fueron capturados usando perlas de estreptavidina y las partículas de fago unidas a las perlas de estreptavidina se recogieron con un separador magnético. Los fagos unidos inespecíficos se lavaron por varias etapas de lavado utilizando PBS/Tween20 al 0.05% y PBS. Los fagos específicamente unidos se eluyeron a partir de esferas de estreptavidina mediante el uso de DTT 25 mM en Tris/HCl 10 mM

a pH 8. La infección por fagos posterior y producción de fagos se realizó de acuerdo con el protocolo de Paneo de Fase Sólida y se inició la siguiente ronda de Paneo.

Expresión:

5 [00324] Para facilitar la expresión rápida de Fab soluble, los insertos que codifican Fab de las partículas de fagos HuCAL® PLATINUM seleccionadas se subclonaron a partir del vector de exhibición pMORPH®30 en el vector de expresión de pMORPH®x11 pMORPH®11_FH. Después de la transformación del clón único TG1-F de E.coli, la expresión y preparación de extractos
10 periplásmicos que contienen fragmentos Fab HuCAL® se realizaron como se describió previamente (Rauchenberger, 2003, J Biol Chem 278: 38194-38205).

 [00325] Se recolectaron clones individuales resistentes a cloranfenicol en los pozos de una placa de microtitulación estéril de 384 pozos precargada con medio 2xYT y cultivada o/n a 37 °C. A la mañana siguiente, se
15 añadió medio que contenía glicerol en cada pozo de las placas maestras; placas se sellaron con papel aluminio y se almacenaron a -80 °C.

Cribado por ELISA

 [00326] Se identifican los clones simples de Fab, usando un cribado de ELISA como resultado del paneo para la unión al antígeno blanco. Los Fabs
20 se probaron usando los lisados crudos de E. coli que contienen Fab. Para la verificación de la expresión de Fab en los lisados de E. coli preparados, se recubrieron placas Maxisorp™ de 384 pozos con IgG anti-humano de oveja específico de fragmento Fd diluida 1:1000 en PBS. Tras el bloqueo con 5% de
25 leche descremada en polvo en PBS que contenía Tween 20 al 0.05%, se añadieron lisados de E. coli que contienen Fab. Posteriormente, se detectaron los Fragmentos Fab- unidos HuCAL® por incubación con IgG anti-humana de cabra específica a F(ab)2 conjugados con fosfatasa alcalina (diluidos 1:5000) seguido de la adición de sustrato de fluorescencia AttoPhos (Roche, #
30 11681982001). La emisión de fluorescencia se registró a 535 nm con excitación a 430 nm.

 [00327] Para llevar a cabo el tamizaje ELISA en antígeno directamente recubierto, se recubrieron placas Maxisorp™ de 384 pozos con

diferentes antígenos TSLP a una concentración de 2 µg/ml en PBS. Tras el bloqueo de las placas con un 5% de leche descremada en polvo en PBS, se añadieron los lisados de *E.coli* que contenían Fab. La unión de los Fabs se detectó mediante una IgG anti-humana de cabra específica a F(ab)2 conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000) usando un sustrato de fluorescencia Attophos® (Roche, #11681982001). La emisión de fluorescencia se registró a 535 nm con excitación a 430 nm.

5 [00328] Para llevar a cabo el tamizaje ELISA en antígeno capturado por APP, se recubrieron placas Maxisorp™ de 384 pozos con anticuerpo específico anti-APP a una concentración de 2,5 µg/ml en PBS. Después del
10 bloqueo de las placas con 5% de leche descremada en polvo en PBS, los antígenos TSLP marcados con APP a una concentración de 2 µg/ml se dejaron que se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se agregaron lisados de *E. coli* que contenían Fab.. La unión de los Fabs se detectó mediante
15 una IgG anti-humana de cabra específica a F(ab)2 conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000) usando un sustrato de fluorescencia Attophos® (Roche, #11681982001). La emisión de fluorescencia se registró a 535 nm con excitación a 430 nm.

[00329] Para realizar el tamizaje ELISA de antígeno biotinilado, se
20 recubrieron placas Maxisorp™ de 384 pozos con la IgG anti-humana de oveja específica al fragmento Fd (El sitio de unión, # PC075) diluida 1: 1000 en PBS o IgG de ratón específica anti-His (R&D, # MAB050), respectivamente. Tras el bloqueo con leche en polvo descremada al 5%, se añadieron los lisados de *E.coli* que contenían Fab. Posteriormente los fragmentos HuCAL®-Fab capturados se
25 dejaron unirse a 0.7-1.5 µg/ml de hu TSLP biotinilado, hu TSLP o cy TSLP respectivamente, que se detectó por incubación con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina seguido de la adición de sustrato de fluorescencia AttoPhos (Roche, # 11681982001). La emisión de fluorescencia se registró a 535 nm con excitación a 430 nm.

30 [00330] Los antígenos biotinilados (2.5-5 µg/ml) también fueron capturados en placas revestidas con Neutravidina. Tras el bloqueo con leche en polvo descremada al 5%, se añadieron los lisados de *E.coli* que contenían Fab.

La unión de los Fabs se detectó mediante una IgG anti-humana de cabra específica a F(ab)₂ conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000) usando un sustrato de fluorescencia Attophos® (Roche, #11681982001). La emisión de fluorescencia se registró a 535 nm con excitación a 430 nm.

5 [00331] 9984 clones (384 clones/subcódigo de paneo) se analizaron con Cribado por ELISA primario en TSLP_Avi-APP6 humano biotinilado y TSLP_APP6-Avi cyno biotinilado recubierto por placas NA (véase 3.4.4). Los resultados de ELISA se analizaron con el programa GENios Pro "PrimeScreen." Los resultados se analizaron en comparación con la señal de fondo. Para
10 antígeno humano sólo se seleccionaron pozos con señales > 10x el fondo y para los pozos de antígeno cyno pozos con señales > 5x el fondo como positivos. Las señales inferiores a fondo 5x es probable que sean el resultado del Fab expresado bajo, Fab de baja afinidad, efectos de borde de la placa de microtitulación, o valores no reproducibles. El Paneo de solución resultó en 3133,
15 el Paneo de fase sólida en 240 hits primarios. 1472 hits primarios seleccionados fueron analizados en el tamizaje ELISA secundario.

 [00332] Diferentes modos de presentación de antígenos se usaron en el tamizaje ELISA secundario, incluyendo los antígenos marcados con Avi-APP6 C- o N- terminales, antígenos directamente recubiertos, antígenos
20 biotinilados presentados en la solución, antígenos derivados de HEK, antígenos derivados de *E. coli*, variantes de-glicosiladas de los antígenos (tratados con PNGasa). Además, la unión no específica al contra objetivo IL-7 se analizó en el tamizaje secundario. Para excluir a los que se unen a biotina y a etiquetas, se utilizó un antígeno etiquetado APP-Avi con un contenido de biotina irrelevante.
25 Los resultados de ELISA se analizaron con el programa GENios Pro "PrimeScreen" y los resultados se analizaron en comparación con la señal de fondo. Para el antígeno irrelevante y el contra objetivo IL-7, solamente se seleccionaron hits con señales < 2 veces el fondo.

 [00333] Los resultados del tamizaje secundario indican que el modo
30 de presentación de antígeno es crucial para la reactividad cruzada. El cribado sobre un antígeno deglicosilado mostró que puede haber enlazadores que se dirigen a un epítipo glicosilado. Adicionalmente, la ubicación de la etiqueta y la

composición de la etiqueta pueden influir en la reactividad debido a cambios conformacionales. Los clones se agruparon de acuerdo a sus perfiles de reactividad cruzada lo que resulta en siete grupos diferentes de reactividad cruzada. El grupo 1 a 3 comprende todos los clones que tienen reactividad
5 cruzada con huTSLP derivado de E.coli ya sea solo o en combinación con antígenos derivados de HEK. El Grupo 4 incluye todos los clones que tienen al menos reactividad cruzada con TSLP_Avi-APP6 humana presentada en la solución. En contraste el grupo 5 incluye todos los clones que tienen reactividad cruzada con TSLP_Avi-APP6 humana en solución exclusivamente. En el grupo
10 6 se encuentran todos los clones que tienen reactividad cruzada con TSLP_Avi-APP6 humana y con TSLP_Avi-APP6 humana deglicosilada, y en el grupo 7 se encuentran todos los clones que tienen reactividad cruzada con todos los antígenos derivados de HEK, incluyendo los antígenos desglicosilados.

Secuenciación y Conversión a IgG

15 [00334] El análisis de secuencia se llevó a cabo en 73 clones del grupo de reactividad cruzada 1-3 (clones de reacción cruzada a TSLP derivado de *E. coli*) y 569 clones de los grupos 4-7 (clones que tienen reactividad cruzada con antígenos derivados de HEK). En total, se identificaron 297 clones únicos de HCDR3, 222 clones fueron consolidados, y 124 clones fueron purificados en
20 formato Fab.

[00335] Los clones derivados del tercer y cuarto análisis de secuenciación fueron puestos inmediatamente en la conversión de IgG. y posteriormente clonados en el vector pMORPH®4_IgG1f para la expresión en células mamíferas.

Determinación de Afinidad

25 [00336] La determinación de la constante de disociación (K_D) de la Fab HuCAL® y la versión IgG de clones se realizó como sigue: TSLP humana biotinilada se revistió a 0.2 µg/ml en agente tampón de ensayo durante 1 hora a TA en placas MSD de estreptavidina. Las placas de estreptavidina se bloquearon
30 durante la noche a 4 °C con PBS con BSA al 3% antes del revestimiento de antígeno. La titulación de equilibrio de solución (SET) se realizó con TSLP humana y TSLP cyno en las condiciones descritas a continuación. Se utilizaron

fracciones de monómeros de la proteína de anticuerpo (contenido de monómero al menos 90%, analizado por SEC analítico; Superdex75 (Amersham Pharmacia) para Fab, o Tosoh G3000SWXL (Tosoh Bioscience) para IgG, respectivamente).

[00337] La determinación de afinidad en solución se realizó básicamente como se describe en la literatura (Friquet, 1985, J Immunol Meth 77, 305-319). Para mejorar la sensibilidad y la precisión del método SET, se hizo una transferencia del ELISA clásico a la tecnología basada en ECL (Haenel, 2005, Anal Biochem 339, 182-184). 1 mg/ml de anticuerpos específicos a fragmentos (Fab)₂ anti-humanos de cabra (Dianova) fueron etiquetados con MSD sulfo-TAG[™] NHS-éster (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

[00338] Los experimentos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de polipropileno y PBS pH 7,4 que contienen BSA al 0.5% y Tween-20 al 0.02% como agente tampón de ensayo. El antígeno sin marcar se diluyó en una 2da serie, comenzando con una concentración de al menos 10 veces más el K_D esperado. Se utilizaron pozos sin antígeno para determinar los valores B_{max}; se utilizaron pozos que contienen sólo agente tampón de ensayo para determinar el fondo. Después de la adición de la cantidad adecuada de aglutinante (concentración de anticuerpos similar o por debajo del K_D esperado, 60 µl de volumen final), la mezcla se incubó durante la noche a temperatura ambiente.

[00339] Las placas MSD se recubrieron con antígeno (30µl por pozo). Después de lavar la placa con PBS con Tween-20 al 0.02%, las muestras equilibradas fueron transferidas a esas placas (30 µl por pozo) y se incubaron durante 20 min. Después del lavado, se agregó 30 µl por pozo del anticuerpo de detección marcada con la etiqueta MSD-sulfo ((Fab)₂ anti-humano, dilución final típicamente 1: 2000) a la placa MSD y se incubaron durante 30 min a TA en un agitador Eppendorf (700 rpm).

[00340] Después de lavar la placa MSD y la adición de 30 µl/pozo de MSD agente tampón T de lectura con surfactante, se detectaron las señales de electroquimioluminiscencia mediante un equipo Imager Sector 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE.UU.).

[00341] Los datos se evaluaron con software XLfit (IDBS) aplicando los modelos de ajuste a medida. Para la determinación de K_D de las moléculas Fab se utilizó el siguiente modelo de ajuste (según Haenel, 2005), modificado de acuerdo con) (Abraham et al., 1996):

$$y = B_{\max} - \left(\frac{B_{\max}}{2[Fab]_t} \left([Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

5

[Fab]_t: Concentración total aplicada de Fab

x: Concentración total aplicada de antígeno soluble (sitios de unión)

B_{max}: Máxima señal de Fab sin antígeno

K_D: Afinidad

10 [00342] Para la determinación de la K_D de las moléculas de IgG se utilizó el siguiente modelo de ajuste para IgG (modificado de acuerdo con Piehler, 1997):

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left(\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right)$$

[IgG]: Concentración total aplicada de IgG

15 x: Concentración total aplicada de antígeno soluble (sitios de unión)

B_{max}: Máxima señal de Fab sin antígeno

K_D: Afinidad

[00343] La afinidad también puede determinarse por resonancia de
20 plasmón de superficie Biacore (SPR) mediante la determinación de las constantes de tasa cinéticas utilizando el instrumento Biacore 3000 o T200 (Biacore, GE Healthcare). La determinación de K_D Biacore a través de antígeno directamente revestido se realiza básicamente de la siguiente manera: El antígeno humano 50 RU biotinilado de TSLP fue capturado sobre un chip de SA
25 (Biacore, GE Healthcare). La celda de flujo de referencia 1 se mantuvo en blanco.

PBS pH 7.2 GIBCO + Tween 20 al 0.05% se utilizó como agente tampón de ejecución con una tasa de flujo de 30µl/min. Las concentraciones de Fab que van de 3.9 a 500 nM fueron utilizadas con un volumen de inyección de 45µl y un tiempo de disociación de 300 seg. La regeneración de analito unido se realizó con inyecciones 2x a 5 µl de glicina 10 mM a pH 1.5. Los datos en bruto se ajustaron a un modelo de unión 1:1, con parámetro(s) R_{max} ajustado en local y RI establecido en 0.

Maduración de Afinidad

[00344] Se seleccionaron siete candidatos Fab para la maduración de afinidad. Para aumentar la afinidad y la actividad biológica de los FabS seleccionados, las regiones L-CDR3 y HCDR2 se optimizaron en paralelo por mutagénesis de cassette usando mutagénesis dirigida de trinucleótidos (Virnekas, 1994, Nucleic Acids Res 22.: 5600-5607), mientras que las regiones marco se mantuvieron constantes. Para la optimización de L-CDR3 de LOS fragmentos Fab precursores, la LCDR3, el marco 4 y la región constante de las cadenas ligeras (405 pb) del grupo de enlazadores se eliminaron mediante digestión enzimática y se sustituyeron por un repertorio de L-CDR3s diversificadas junto con el marco 4 y el dominio constante. En un segundo conjunto de librerías el H-CDR2 se diversificó, mientras que las regiones de marco de conexión se mantuvieron constantes. Las mezclas de ligación se sometieron a electroporación en 4 ml de células TOP10F de E. coli produciendo de 10⁸ a 10⁹ colonias independientes. Este tamaño de la librería garantiza la cobertura de la diversidad teórica. La amplificación de la biblioteca se realizó como se describió (Rauchenberger, 2003 J Biol. Chem. 278: 38194-38205). Para el control de calidad, los clones individuales fueron recogidos y secuenciados al azar. Para la selección de la afinidad mejorada, los aglutinantes fago derivados a partir de bibliotecas de maduración se sometieron tes rondas de solución de paneo usando un antígeno humano biotinilado de TSLP_Avi-APP6 y de Cynomolgus TSLP_APP6-Avi.. La rigurosidad se incrementó mediante la reducción de la concentración de antígeno en cada ronda de paneo (Low, 1996, J Mol Biol 260, 359-368. 1996.). Además de la reducción de la tasa de selección

del antígeno (Hawkins, 1992, J Mol Biol 226, 889-896). Esto se combinó con pasos de lavado prolongados a temperatura ambiente.

[00345] Para aumentar aún más la afinidad y la actividad biológica de algunos fragmentos de anticuerpos seleccionados, las regiones L-CDR1, L-CDR3, H-CDR2, H-CDR1 se optimizaron en paralelo por mutagénesis de cassette usando mutagénesis dirigida a trinucleótidos (Virnekas, 1994, Nucleic Acids Res 22: 5600-5607), mientras que las regiones marco se mantuvieron constantes.

[00346] No se desean modificaciones posteriores a la traducción (PTMs) en las CDRs puesto que la potencia de tales anticuerpos potencialmente podría disminuirse dependiendo de la posición de la PTM, además, las PTMs podrían llevarse en el compuesto no homogéneo. Antes de la maduración de afinidad, las variantes carentes de sitios GN, NS, y DG se generaron y se incluyeron en un grupo con el clon precursor con el proposito de seleccionar variantes removidas por PTM durante el proceso de selección. Fab que contiene lisados celulares bacterianos crudos de las variantes generadas se ensayaron para la unión a antígeno en ELISA en TSLP humana. El ADN plásmido de las variantes se mezcló con el ADN precursor para la generación de bibliotecas de maduración.

[00347] Para la clasificación de los aglutinantes madurados por Titulación de Equilibrio de Solución con base en los principios descritos por Haenel, 2005, Anal Biochem 339: 182-184, una cantidad constante de extracto BEL diluido se equilibró durante la noche con diferentes concentraciones de antígeno. A continuación, la mezcla se transfirió a placas MSD que anteriormente se recubrieron con antígeno, y después de la incubación y el lavado, se añadió anticuerpo de detección adecuado marcado con la etiqueta MSD-sulfo. Posteriormente, se cuantificó la concentración de Fab no unido a través de la detección ECL con el equipo Imager Sector 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE.UU.). Los resultados fueron procesados utilizando software XLfit (IDBS), aplicando el modelo de ajuste correspondiente para estimar las afinidades y así identificar los clones que se han mejorado mediante la maduración.

Producción

[00348] Las células eucariotas HKB11 se transfectaron con ADN del vector de expresión pMORPH®4 que codifica ambas las cadenas pesadas y ligeras de Fabs anti-TSLP o IgGs. El sobrenadante del cultivo celular se cosechó
5 3 o 6 días después de la transfección. Después de la filtración estéril, la solución se sometió a una cromatografía de afinidad de la Proteína A (Mabselect SURE™, GE Healthcare) usando una estación de manipulación de líquidos. Si no se indica de otro modo, se realizó el intercambio de agente tampón a PBS 1X de Dulbecco (pH 7,2, Invitrogen) y las muestras fueron filtradas de manera estéril (0.2 µm de
10 tamaño de poro). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante espectrofotometría UV y la pureza de las IgGs se analizó bajo condiciones reductoras desnaturalizantes utilizando un sistema Labchip® (Perkin Elmer, USA).

Fab1 anti-TSLP

15 [00349] Fab1 Anti-TSLP se deriva de la familia MOR011086, que se identificó en los paneos iniciales. La maduración de afinidad de MOR011086 resultó en la generación de MOR014051, que incluyó un motivo de modificación postraduccional DG en la HC-CDR2. La remoción de este fragmento DG permite la generación de MOR14701 (DG→DA), la cual es luego usada para formar una
20 línea germinal para producir el MOR014824, es decir, mAb1 en la Tabla 2. El Fab1 anti-TSLP en la Tabla 2 es el fragmento Fab de mAb1.

[00350] Se determinaron las secuencias de aminoácidos de CDRs de cadena pesada de Fab1 anti-TSLP (HCDRs), CDRs de cadena ligera (LCDRs), por Kabat, Chothia, o esquemas de numeración combinados, así como
25 las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y se enumeran en la Tabla 2. Fab1 Anti-TSLP vinculado con muy alta afinidad ($K_D = 6$ pM) a TSLP humana recombinante según lo determinado por SET. Fab1 Anti-TSLP no se unió a una citoquina estructuralmente similar, IL-7.

Ejemplo 2: Potencia de Fab1 anti-TSLP contra TSLP humana recombinante y segregada de forma natural en ensayos de genes reporteros

[00351] La potencia de Fab1 anti-TSLP contra una TSLP humana recombinante, una TSLP humana secretada de forma natural y TSLP Cyno se probaron en un ensayo de genes reporteros de luciferasa.

Materiales y Métodos

[00352] La TSLP humana secretada de forma natural se obtuvo a partir de células de fibroblastos de pulmón humano por la estimulación con IL-1 α , TNF- α y IL-13 durante 24 horas.

10 [00353] Las células Ba/F3 fueron transfectadas con hTSLPR, hIL7R α y un constructo reportero de luciferasa STAT5. Stat5 es un efector aguas abajo de la señalización de TSLP. Las células fueron cultivadas en el medio de crecimiento celular: RPMI 1640 (Invitrogen, Grand Island, NY) con CFIII al 10% (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), 1% penicilina/estreptomicina
15 (Invitrogen, Grand Island, NY), 1 μ g/ml de puromicina (Sigma, St. Louis, MO) y 5 ng/ml de TSLP humana recombinante (rhTSLP, R&D Systems, Minneapolis, MN). El agente tampón de Ensayo Reportero se hizo utilizando RPMI 1640 con CFIII al 10%, 1% penicilina/estreptomicina, y 1 μ g/ml de puromicina.

[00354] Las células Ba/F3 fueron cultivadas en suspensión en un
20 matraz T162cm² y se dividieron 1:50 dos veces a la semana. Las células Ba/F3 se recolectaron y sedimentaron en la fase de crecimiento semilogarítmica mediante centrifugación a 200xg durante 5 minutos y se lavaron en medio de crecimiento celular libre de TSLP. Esto se repitió y después se incubó durante 18-24 horas en condiciones libres de TSLP. Al día siguiente las células se
25 sedimentaron de nuevo por centrifugación a 200 xg durante 5 minutos y se resuspendieron en el agente tampón de Ensayo Reportero a una concentración celular de 1x10⁶ células/ml. 10 μ l de células Ba/F3 a 1x10⁶/ml se combinaron con 70 μ l de agente tampón de Ensayo Reportero en cada pozo de una placa blanca Optiplate de 96 pozos (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). Esto fue seguido
30 por 10 μ l de una dilución serial 1:10 de 6 puntos de anticuerpo (concentración final superior 100 nM) y se incubó durante 30 minutos a 37 °C/CO₂ al 5% en un incubador humidificado. Finalmente, 10 μ l de 0.5 ng/ml de TSLP humana o cyno

o una concentración calculada de TSLP secretada de forma natural, con la misma actividad relativa, y la placa se selló para reducir la evaporación, y se incubó durante 4 horas a 37° C/CO2 al 5% en un incubador humidificado. Luego la placa se retiró de la incubadora, y se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Esto fue seguido por la adición de 100 µl de reactivo Steady-Glo (Promega, Madison, WI) a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego las placas se leyeron en el instrumento Envision, utilizando el programa de luminiscencia (exposición de cámara 1 segundo por pozo) y los datos se analizaron en Microsoft Excel y GraphPad Prism.

Resultados

[00355] Fab1 Anti-TSLP demostró una excelente potencia frente a las tres formas de TSLP en el ensayo de gen reportero de luciferasa, con IC50 de 15.4 pM contra la TSLP humana recombinante (1 ng/ml), IC50 de 171 pM contra la TSLP humana secretada de forma natural, y IC50 de 10.8 contra la TSLP Cyno. Cuando se calcularon los resultados medios del ensayo del gen reportero para múltiples experimentos (n= 3), el valor medio de IC50 para Fab1 contra TSLP humana recombinante fue 15.3 pM ± 1.5 pM de EME. Los valores medios de IC50 para Fab1 contra TSLP cyno fue 9.5 pM ± 0.9 pM de EME.

[00356] Por lo tanto, Fab1 anti-TSLP es un potente inhibidor de la TSLP humana y Cyno con potencia picomolar. El hecho de que el Fab1 anti-TSLP demostró una excelente potencia frente a la TSLP secretada de forma natural a partir de fibroblastos de pulmón humano redujo la probabilidad de problemas causados por la glicosilación diferencial de TSLP humana activa en el cuerpo y de la TSLP humana recombinante utilizada para generar los Fabs anti-TSLP.

Ejemplo 3: La inhibición de secreción de TARC (Quimiocina Regulada por Timo y Activación) inducida por TSLP a partir de células mononucleares primarias de sangre periférica humana (PBMC) por Fab1 anti-TSLP

[00357] Para determinar si Fab1 anti-TSLP fue capaz de neutralizar TSLP en el contexto de una respuesta promovida por células primarias, la

secreación de TARC inducida por TSLP humana o Cyno a partir de PBMCs humanas se probó en presencia o ausencia de Fab1 anti-TSLP.

Materiales y Métodos

[00358] Sangre venosa tomada de donantes sanos fue heparinizada
5 (Sigma, St. Louis, MO) y recolectada en jeringas de 50 ml y luego se dividió en dos tubos Falcon estériles, 25 ml en cada uno. Estos tubos se centrifugaron a 1200 rpm durante 20 minutos con una baja aceleración y desaceleración antes de retirar la capa de plasma utilizando una pipeta Pasteur. 20 ml de sangre de cada tubo se transfirió a tubos Falcon frescos de 50 ml y 20 mL de PBS (1x,
10 Invitrogen, Grand Island, NY) y se agregó 10 mL de dextrano al 4% (peso/peso, Sigma, St. Louis, MO) a cada uno. Los tubos se invirtieron para mezclar meticulosamente la sangre y el dextrano y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir que los globulos rojos se sedimentaran. 20 ml de sobrenadante se transfirieron a un tubo Falcon fresco de
15 50 ml y se lavaron con 30 ml de PBS (1.400 rpm durante 8 minutos) antes de aspirar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 10 mL de PBS.

[00359] Para lisar los globulos rojos, se añadió 20 mL de agua destilada fría estéril (Sigma, St. Louis, MO) a las células y se mezcló con una pipeta de 20 ml durante 1 minuto antes de añadir 20 ml de PBS 2x frío estéril
20 para detener la lisis. Los tubos se invirtieron varias veces y se centrifugaron a 1400 rpm durante 8 minutos antes de ser agrupados en un tubo y se lavaron dos veces con el agente tampón de ensayo (1400 rpm, 8 minutos). El agente tampón de ensayo se hizo con RPMI 1640 (con Glutamax, Invitrogen, Grand Island, NY) con suero AB humano al 10% (Life Technologies, Grand Island, NY) y 1%
25 penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Grand Island, NY).

[00360] Las células se contaron y se resuspendieron a una concentración de 10×10^6 células por ml, 100 μ l de las cuales se añadieron a cada pozo de una placa de fondo plano de 96 pozos (1×10^6 células por pozo). 50 μ l/pozo de anticuerpo anti-TSLP se añadieron en cada pozo y se dejaron
30 incubar durante 30 minutos a 37°C antes de la adición de TSLP humana o Cyno, produciendo una concentración final de 1 ng/ml de TSLP (66pM). Las células se incubaron durante 24 horas antes de que las placas se centrifugaron a 1300 rpm

durante 5 minutos y se recolectaron los sobrenadantes para el análisis de ELISA de la quimiocina de Timo y Activación Regulada (TARC). Los sobrenadantes se analizaron a -20°C hasta que fueron descongelados para su análisis en el TARC ELISA (muestras analizadas puras).

- 5 [00361] El análisis TARC ELISA se realizó siguiendo los protocolos del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Brevemente, anticuerpo de captura se diluyó a la concentración de trabajo en PBS sin proteína portadora. Microplacas inmunes Maxisorp (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) se recubrieron con 100 µl por pozo de anticuerpo de captura diluido, las placas se sellaron con
- 10 tapas superiores adhesivas de sellado y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente el anticuerpo de captura se aspiró y las placas se lavaron con agente tampón de lavado, repitiendo el proceso dos veces para un total de tres lavados. Los pozos se lavaron llenando cada pozo con un enjuague de 30 µl de tampón usando un dispensador manifold o un autolavador.
- 15 Después del último lavado, el buffer de lavado remanente fue descartado al invertir la placa y secarla con toallas limpias de papel. Luego las placas se bloquearon mediante la adición de 300 µL de diluyente reactivo (BSA al 1% en PBS) a cada pozo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora. Las etapas de lavado se repitieron y 100 µl de la muestra o
- 20 estándares en diluyente reactivo se añadieron por pozo. Las placas se cubrieron con una cinta adhesiva y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las etapas de aspiración/lavado luego se repitieron y se añadieron 100 µl de anticuerpo de detección diluido a cada pozo, se cubrió con una nueva cinta adhesiva y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente antes de repetir la
- 25 etapa de lavado como se describió anteriormente. 100 µl de la dilución de trabajo de estreptavidina-HRP se añadió a cada pozo y las placas luego se volvieron a cubrir y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, evitando la colocación de la placa en la luz directa. Las etapas de lavado/aspiración luego se repitieron y se añadieron 100 µl de solución de sustrato TMB a cada pozo.
- 30 Las placas se incubaron durante hasta 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, seguido por la adición de 50 µl de solución de parada. La placa se golpeó suavemente para asegurar la mezcla de los pozos y la densidad óptica

de cada pozo se determinó inmediatamente utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

Resultados

[00362] Fab1 Anti-TSLP fue un inhibidor muy potente de la secreción
5 TARC inducida por TSLP humana recombinante a partir de PBMC humana con una CI50 de 20.3 pM y IC90 de 99.65 pM contra 1 ng/ml de TSLP humana recombinante. Fab1 Anti-TSLP se mostró como un potente inhibidor de secreción TARC inducida por TSLP Cyno a partir de PBMC humana con una CI50 de 11.3 pM contra 1ng/ml de TSLP Cyno recombinante. Cuando se
10 calcularon los resultados medios del PBMC humana para múltiples experimentos (n= 3), el valor medios de IC50 para Fab1 contra TSLP humana recombinante fue 19.7 pM $\pm$ 1.9 pM de EME. El valor de IC50 media para Fab1 contra TSLP cyno fue 11.1 pM $\pm$ 0.5 pM de EME.

15 **Ejemplo 4: La inhibición de secreción de MDC (quimiocina derivada de macrófagos) inducida por TSLP a partir de células mononucleares primarias de sangre periférica Cyno (PBMC) por Fab1 anti-TSLP**

Materiales y Métodos

[00363] Se recogió sangre venosa de Cyno en tubos vacutainer que contienen heparina de litio por Covance (Dedham, MA). 30 ml de sangre de
20 cada donante se transfirió a tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó a 1200 rpm durante 20 minutos con una baja aceleración y desaceleración antes de retirar la capa de plasma usando una pipeta Pasteur, dejando un espacio de 0.5 cm entre las capas. La capa inferior restante de las células se resuspendió y se transfirió 10 ml a tubos Falcon frescos seguido de 10 ml de 1x PBS y 5 ml de dextrano al
25 4% (peso/volumen, Sigma, St. Louis, MO) antes de invertir los tubos 4-5x para mezclar completamente. Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente en una campana extractora durante 25 minutos para permitir que los glóbulos rojos se sedimenten en el fondo del tubo. 10 mL de sobrenadante se transfirieron a un tubo Falcon fresco de 50 ml y se lavaron con 40ml de medio de cultivo
30 (1.400 rpm durante 8 minutos) antes de aspirar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 5 mL de 1xPBS.

[00364] Para lisar los globulos rojos, se añadió 20 mL de agua destilada fría estéril (Sigma, St. Louis, MO) a las células y se mezcló con una pipeta de 20 ml durante 1 minuto antes de añadir 20 ml de PBS 2x frio estéril para detener la lisis. Los tubos se invirtieron varias veces y se centrifugaron a 1400 rpm durante 8 minutos antes de ser agrupados en un tubo y lavados dos veces con el medio de cultivo (1400 rpm, 8 minutos, 4°C). El medio de cultivo se hizo con RPMI 1640 (con Glutamax, Invitrogen, Grand Island, NY) con clon fetal III al 10% (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y 1% Penicilina/ Estreptomicina (Invitrogen, Grand Island, NY).

[00365] Las células se contaron utilizando tinte azul de Tripano y se resuspendieron a una concentración de 10×10^6 células por ml, 100 µl de las cuales se añadieron a cada pozo de una placa de fondo plano de 96 pozos (1×10^6 células por pozo). 50 µl/pozo de anticuerpo anti-TSLP (concentración final superior 100 nM) se añadieron en cada pozo y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C antes de la adición de TSLP Cyno, produciendo una concentración final de 0.5ng/ml de TSLP (33pM). Las células se incubaron durante 24 horas antes de que las placas se centrifugaron a 1400 rpm durante 8 minutos y los sobrenadantes se recogieron para análisis de quimiocina derivada de macrófagos (MDC, CCL22) por ELISA. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta que se descongelaron para el análisis en ELISA MDC (diluido 1:2 en agente tampón de ensayo antes de la adición a la placa ELISA). El análisis MDC ELISA se realizó siguiendo los protocolos del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Resultados

[00366] Fab1 Anti-TSLP se mostró como un potente inhibidor de secreción MDC inducida por TSLP Cyno recombinante a partir de PBMC Cyno con una CI50 de 55.5 pM contra 0,5 ng/ml de TSLP Cyno recombinante. Cuando se calcularon los resultados de PBMC Cyno media para múltiples experimentos (n= 3), el valor de IC50 media para Fab1 contra TSLP cyno fue $25.1 \text{ pM} \pm 5.9 \text{ pM}$ de EME.

Ejemplo 5: Reactividad cruzada de las especies de Fab1 anti-TSLP

Materiales y Métodos

[00367] Los análisis de unión de resonancia de plasmones superficiales Biacore (SPR) se llevaron a cabo para determinar si el Fab1 anti-TSLP se une a la proteína TSLP humana, de ratón, o de rata. Los reactivos Biacore, incluyendo las series del Sensor S Chip CM5, HBS-EP+ buffer, it de
5 captura de Fab humano, EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida), NHS (N-hidroxisuccinimida), etanolamina, solución BIAnormalizante, 70% (p/p) glicerol, y glicina, se adquirieron en GE Healthcare. El agente tampón de corrida utilizando para ambos la captura de Fab y los análisis de unión a TSLP fue 1X
10 HBS-EP +, con HEPES 10 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, surfactante P20 al 0.05% volumen/volumen. TSLP recombinante humana, cyno, o de ratón (MW 15 kDa) se obtuvo en R&D Systems (Minneapolis, MN). TSLP recombinante de rata (MW 15,4 kDa) se obtuvo de USCN Life Science Inc. (Wuhan, China).

[00368] Un enfoque de captura se utilizó para preparar Fab1 anti-TSLP en un chip CM5 de Biacore antes de la inyección de TSLP humana, de
15 ratón o de rata. El aglutinante de Fab humano se inmovilizó sobre todas las cuatro células de flujo de un chip CM5 usando un kit de captura Fab humana siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ha especificado un tiempo de contacto de 360 segundos a una tasa de flujo de 10 ul/min. La temperatura del compartimiento de muestra fue de 10 °C y la temperatura de análisis fue 25 °C;
20 antes de la inmovilización, el chip CM5 se cebó con HBS-EP + y se normalizó con solución de normalización BIA. Se preparó 375uL de 20 ug/mL de aglutinante Fab humano combinando 15uL 0.5 mg /mL de stock con 360uL de agente tampón de inmovilización a pH5 (ambos proporcionados en el kit de captura Fab humano). Los niveles de inmovilización resultantes fueron
25 aproximadamente 4000-4400RU de aglutinante Fab humano en Fc1, 2, 3 y 4.

[00369] Se utilizó un método común Biacore para configurar un ensayo cinético en el que se capturó 14RU aproximadamente de Fab1 anti-TSLP por ciclo. Esto se consiguió mediante la inyección de Fab1 anti-TSLP 5 nM en
30 agente tampón HBS-EP+ con un tiempo de contacto de 60s a una tasa de 10 uL/min, seguido de un período de estabilización de 30 segundos. La temperatura del compartimiento de muestra fue de 10 °C y la temperatura de análisis fue 25°C. Usando este método común Biacore, se configuró un ensayo de cinética

para evaluar la interacción de hTSLP, mTSLP, y rTSLP con Fab1 anti-TSLP capturado. Para cada antígeno, las siguientes 10 concentraciones se prepararon en HBS-EP+ y se inyectaron sobre la superficie de Fab1 anti-TSLP, incluyendo un buffer blanco 0nM, 10nM, 5nM, 2.5nM, 1.25nM, 0.625nM, 0.313nM, 0.156nM, 5 0.078nM, 0.039nM, 0.02nM. Después de la captura de ~ 14RU de Fab1 anti-TSLP, el antígeno se inyectó a 45 uL/ min durante 360 segundos, seguido de un período de disociación de 600 segundos (para todas las concentraciones probadas) o 1200 s (para concentraciones de antígeno 0nm y 2.5 Nm). La regeneración de la superficie enlazante del Fab se logró después de cada ciclo 10 mediante la inyección de glicina-HCl 10 mM, pH 2,0 durante 60s a 10 ul/min, seguido por un lavado adicional con agente tampón HBS-EP+. La temperatura del compartimiento de muestra fue de 10 °C y la temperatura de análisis fue 25 °C.

[00370] Todos los experimentos y análisis de SPR se realizaron en 15 instrumentos Biacore T200 controlados por el software de control Biacore T200. Los datos se procesaron utilizando el software Biacore T200 Evaluación. Se graficaron sensorgramas de blanco sustraído para el análisis cualitativo de la reactividad cruzada de las especies del Fab 1 anti-TSLP.

Resultados

20 [00371] Los resultados experimentales de reactividad cruzada de SPR Biacore mostraron unión fuerte de Fab1 anti-TSLP a TSLP humana recombinante, mientras que no hay ninguna unión detectable a TSLP recombinante de rata o de ratón, lo cual es coherente con la baja homología entre TSLP humana y de roedor (aproximadamente 40%).

25 [00372] Fab1 Anti-TSLP se unió con muy alta afinidad a TSLP recombinante de mono cynomolgus y fue un inhibidor muy potente de TSLP cyno recombinante (IC₅₀ = 10.8 pM contra 1 ng/ml de TSLP recombinante) en el ensayo de gen reportero de luciferasa. En ambos ensayos primarios de PBMC humana y cyno, Fab1 anti-TSLP fue un inhibidor muy potente de secreción 30 TARC inducida por TSLP cyno recombinante a partir de PBMC humana (IC₅₀ = 11.3 pM) y secreción de MDC inducida por TSLP cyno recombinante a partir de PBMC cyno (IC₅₀ = 55.5pM).

[00373] Por lo tanto, el Fab1 anti-TSLP mostró reactividad cruzada de especies restringida, reconociendo TSLP cynomolgus recombinante, pero no TSLP de rata o ratón.

Ejemplo 6: Eficacia de anticuerpo anti-TSLP de ratón en modelos murinos de enfermedad de asma

Materiales y Métodos

[00374] El efecto de neutralización de TSLP en las respuestas de las vías respiratorias alérgicas se evaluó en un modelo murino de sensibilización sistémica de ovalbumina (OVA) seguido de una exposición local al antígeno en el pulmón. Este modelo se caracterizó por el desarrollo de un fenotipo Th2 y la inflamación eosinofílica asociada. Puesto que el Fab1 anti-TSLP del Ejemplo 1 no reaccionó de forma cruzada con las proteínas de TSLP de roedor como se describe en el Ejemplo 5, se evaluó el efecto de la neutralización de TSLP utilizando un anticuerpo monoclonal de TSLP anti-ratón sustituto disponible en el mercado (MAB555, R&D Systems, Minneapolis, MN), reportado para neutralizar completamente la actividad biológica de TSLP murina recombinante con una CI50 de aproximadamente 1.3 nM contra TSLP murina 0.5 nM (datos suministrados desde R&D Systems). Kits ELISA específicos para todas las citocinas y quimiocinas también se adquirieron en R&D Systems.

[00375] Ratones hembra Balb/c hembra se inmunizaron con OVA (o solución salina) y alumbre como adyuvante el día 1 y día 14. Brevemente, los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal con 0.2 ml de NaCl al 0.9% peso/volumen (solución salina) que contiene 100 µg de ovoalbúmina (5 x cristalizada, Sigma, Reino Unido) adsorbida en 1.6 mg de hidróxido de aluminio (Sigma). El día 21, los ratones fueron expuestos a OVA o solución salina dada como un aerosol y sacrificados 24h más tarde. La inflamación se evaluó mediante conteos celulares diferenciales y totales dentro del lavado broncoalveolar (BAL), mientras que las citocinas y quimiocinas se midieron por ELISA específica.

[00376] Veinticuatro horas después de la última exposición intranasal a OVA o PBS, los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de 4 mg/Kg de pentobarbital sódico (Rhône Mérieux, Harlow, UK).

El fluido BAL se recolectó mediante canulación de la tráquea y el lavado de los pulmones con un total de 1.2 ml de solución salina (3 x 0.4 ml de cada uno). Para cada muestra, se determinó un recuento total de células y se realizó la preparación citospina (Shandon Scientific Ltd., Cheshire, Reino Unido). Las
5 células se tiñeron con Diff-Quik (Baxter Dade AG, Dudingen, Suiza) y se realizó un recuento diferencial de 200 células usando criterios morfológicos estándar.

[00377] Para evaluar el efecto de agotamiento TSLP en la fase de sensibilización de la respuesta, un anticuerpo monoclonal TSLP antimurino (a 10 mg/Kg) o el isotipo de control de IgG2a de rata se administró por vía intravenosa una hora antes de la sensibilización OVA y de nuevo antes del incremento del
10 día 14. Para evaluar el papel de TSLP en el momento de la exposición, a algunos ratones se les dio sólo anticuerpo una hora antes de la aerosolización con OVA el día 21. No se observaron efectos adversos en la administración intravenosa de estos anticuerpos.

[00378] Los resultados se expresan como medias $\pm$ SEM del número indicado de experimentos. Se utilizó análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para determinar la significación entre los grupos. Si se encontró una
15 variación significativa, se utilizó la prueba t de Student para datos independientes una para evaluar la comparabilidad entre los medios. Un valor de $p < 0.05$ se
20 consideró significativo.

Resultados

[00379] La sensibilización y exposición a OVA dio como resultado un aumento del número de células dentro del fluido de lavado broncoalveolar, que incluye eosinófilos y neutrófilos, en comparación con los animales de control
25 (Fig. 3). Esto es consistente con la experiencia previa de las respuestas después de una sola exposición al antígeno. Además, un número de mediadores inflamatorios también se aumentaron dentro del líquido de lavado de ratones sensibilizados/expuestos a OVA en comparación con los controles (Figs. 4A-4C).

[00380] El tratamiento con anticuerpos anti-TSLP murino (10 mg/kg)
30 inhibió significativamente el número total de células dentro del fluido BAL en aproximadamente 50%, mientras que los recuentos de eosinófilos se redujeron

en un 80%. El tratamiento con anticuerpos en ausencia de sensibilización de antígenos no alteró significativamente la composición celular inicial del lavado. El análisis de marcadores aguas abajo de la actividad de TSLP reveló niveles reducidos de IL-13 (Fig. 4A), una citocina asociada con la inflamación de las vías respiratorias alérgicas y las quimiocinas eotaxina-2 y TARC (Figs. 4B y 4C), ambas conocidas por ser quimioatrayentes de células Th2 y eosinófilos que fueron generados por células dendríticas estimuladas por TSLP.

Ejemplo 7: Caracterización farmacocinética de Fab1 anti-TSLP en ratas

Materiales y Métodos

10 [00381] La farmacocinética (PK) y la disposición pulmonar de Fab1 anti-TSLP se estudiaron en ratas después de inyección intravenosa (IV) en bolo, instilación intratraqueal (ITI), o una inhalación sólo por nariz de 20-min de una única dosis nominal de Fab1 anti-TSLP nebulizado a 1 mg/kg. Las concentraciones de Fab1 anti-TSLP en varios puntos de tiempo después de la
15 dosis se determinaron en plasma, fluido BAL, así como muestras de homogeneizado de pulmón (seguido de BAL y perfusión sanguínea de la vasculatura pulmonar).

Resultados

20 [00382] Fab1 Anti-TSLP se eliminó de la circulación sistémica rápidamente después de la inyección IV, con una vida media de eliminación terminal promedio de 3 horas aproximadamente. Después de ITI o inhalación, el Fab1 anti-TSLP se absorbió lentamente en la circulación sistémica, alcanzando una Cmax plasmática a las 2h para ambas rutas, y las vidas medias terminales promedio fueron mayores que las determinadas después de la
25 administración IV (7 horas después de ITI y 4 horas después de la inhalación, en comparación con 3 horas después de IV), lo que indica una cinética de absorción limitada por tasa. La biodisponibilidad sistémica del Fab1 anti-TSLP promedió alrededor de 6% después de ITI y 1% después de la inhalación, posiblemente debido a una fracción de deposición pulmonar más alta después de ITI en
30 comparación con la inhalación. En comparación con la baja exposición sistémica, las concentraciones de Fab1 anti-TSLP en el fluido BAL y homogeneizado

pulmonar fueron mucho más altas (> 100 veces mayor) después de ITI o inhalación, lo que explica 97-99% de la cantidad total de la dosis recuperada desde todas las tres matrices (66 a 79% para BAL y 20-31% para pulmón) a 2, 6, 24 o 72 horas después de la dosis. Las vidas medias de disposición estimadas de Fab1 anti-TSLP promediaron alrededor de 7 y 9 horas en BAL y homogenizados pulmonares, respectivamente.

Ejemplo 8: Caracterización farmacocinética de Fab1 anti-TSLP en monos ***Materiales y Métodos***

[00383] La toxicocinética, PK/PD, y la distribución pulmonar de Fab1 TSLP fueron estudiadas en macacos siguiendo ya sea inhalación diaria de 1 hora durante 14 días a una dosis de 1, 10 y 20 mg/kg (Grupos 3-5), o una administración de dosis única para todo de 1 mg/kg IV seguido de una única dosis única inhalada de 20 mg/kg después de un período de lavado de 16 días (Grupo 6). Se recogieron muestras de sangre en serie para PK/PD, se elavuyó TSLP total como un marcador DP y se realizaron evaluaciones de inmunogenicidad. Además, también se recolectaron muestras de homogeneizado pulmonar (al finalizar) y muestras de fluido BAL (al finalizar para los grupos 3-5 y antes de la dosis intravenosa y al finalizar para el Grupo 6 PK), para evaluaciones de PK, TSLP total e inmunogenicidad (para fluido BAL solamente).

Resultados

[00384] La exposición sistémica de Fab1 anti-TSLP en el suero fue baja después de la inhalación con una biodisponibilidad estimada de menos de 1% al nivel de dosis inhalado de 20/kg. La dosis inhalada de 1 mg/kg no proporcionó ninguna exposición sistémica detectable y las dosis inhaladas de 10 y 20 mg/kg mostraron una exposición sistémica comparable con Fab1 anti-TSLP. Cmax se alcanzó aproximadamente 3 horas después de la inhalación. Similar a la PK de rata, las vidas medias de eliminación sistémica fueron mayores después de la inhalación (aproximadamente 7 horas) en comparación con IV (aproximadamente 2.3 horas), lo que indica una cinética limitada por la tasa de absorción. Se observó acumulación de la exposición en suero después de 14

días de dosificación. En comparación con la baja exposición sérica (Fig. 5), los datos preliminares sobre las concentraciones de Fab1 anti-TSLP en el fluido BAL terminal y los homogeneizados pulmones fueron mucho más altos y aumentaron con dosis crecientes (Fig. 6).

5 **Ejemplo 9: Cristalografía y Mapeo de Epítomos de Fab1 anti-TSLP**

[00385] En este ejemplo, el Fab1 anti-TSLP se cristalizó en estado libre o en complejo con TSLP humana, y se determinaron las estructuras cristalinas correspondientes. El análisis de unión de Fab1 anti-TSLP a TSLP humana con base en los datos de rayos X proporcionados dentro del epítome de
10 Fab1 anti-TSLP sobre TSLP humana.

Materiales y Métodos

Preparación y purificación de TSLP humana y Fab1 anti-TSLP

[00386] Fab1s Anti-TSLP fueron generados por la digestión de mAb1 anti-TSLP (10.6 mg) con 21µg de la papaína durante 2 horas a
15 temperatura ambiente (RT), en Tris 100 mM (pH 7.0) con DTT 10 mM. La reacción se detuvo con 30µM del inhibidor de papaína E64. A continuación, Fab1 Anti-TSLP se purificó sobre una columna Lambda Select de 5 ml, equilibrada con fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0). El Fab se eluyó con ácido cítrico 0.1 M pH 3,0, y el pH de las fracciones recogidas se ajustó inmediatamente con Tris 1 M
20 pH 8,5 diluido 1:10. El análisis LC-MS mostró una masa observada de 47.107,7 Da que se correspondía con la secuencia de amino-ácidos esperada con la cadena pesada escindida después de Thr228 y teniendo un residuo de ácido piroglutámico en su extremo amino-terminal. Para la cristalización, el agente tampón se intercambió a Tris-HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 25 mM por etapas
25 repetidas de concentración-dilución utilizando un dispositivo de ultrafiltración y la muestra se concentró finalmente a 13 mg/ml de Fab1 anti-TSLP.

[00387] Un constructo de TSLP humana (Uniprot entrada Q969D9; aminoácidos 29 a 159) con una etiqueta de hexahistidina N-terminal (SEQ ID NO: 40) seguido de un sitio de escisión PreScission (proteasa HRV-3C) fue
30 clonado y expresado en *E. coli* como cuerpos de inclusión. Para el replegamiento, 89.4g de células de *E. coli* se lisaron en 715ml de Tris 50 mM (pH 7.0) con EDTA 1 mM, MgCl₂ 6 mM, y sacarosa 0.375 M con un homogeneizador

de alta presión Avestin®. Después de 30 minutos de incubación con 3.7 kU de benzonasa, el lisado se centrifugó durante 30 minutos a 13.000 rpm con un rotor de ángulo fijo SS-34. El pellet se resuspendió en 387ml de Tris 100 mM (pH 7.0) con EDTA 20 mM, NaCl 0.5 M, Triton X-100 al 2% y luego se centrifugó a 13.500 rpm durante 50 minutos. El pellet se resuspendió de nuevo en 387ml de Tris 100 mM pH 7.0 con EDTA 20 mM, se centrifugó a 13.500 rpm durante 30 minutos, y este procedimiento de lavado se repitió cuatro veces, dando lugar a 13 g de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión fueron luego solubilizados en 65 ml de solución de clorhidrato de guanidina 6M con acetato de potasio 50 mM (pH 5.0), EDTA 5 mM, TCEP 10 mM. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó durante 30 minutos a 20.000 rpm (rotor de ángulo fijo SS-34). El sobrenadante (70 ml) se diluyó a 100 ml con la solución de hidrocloreuro de guanidinio descrita anteriormente. El replegamiento se realizó por dilución rápida a 4 °C con 10L de Tris 100 mM (pH 8.25) con hidrocloreuro de arginina 0.5 M, EDTA 5 mM, y GSH 1 mM. Después de la dilución, se añadió disulfuro de glutatión 0.1 mM (GSSG) y la mezcla de replegamiento se incubó con agitación lenta durante 7 días a 4 °C. Luego el pH se ajustó a 5.1 con ácido acético, y se añadió GSSG 0.1 mM para destruir el TCEP restante. La solución de replegamiento ligeramente turbia se filtró por una cápsula de filtro 0.65/0.45µm Sartobran y se concentró con una membrana de flujo cruzado Pellicon 10 kD a 750 ml. La solución concentrada se dializó frente a 10L de acetato sódico 50 mM pH 5.4. Se recuperaron alrededor de 550 mg de TSLP replegada. El análisis LC-MS de la muestra final purificada confirmó que se formaron todos los puentes de disulfuro y mostró producto des-Met al 94% (MW = 16862.8 Da), y proteína al 6% con la metionina N-terminal. Para la cristalización con Fab1 anti-TSLP, se utilizó la muestra de TSLP replegada sin escindir la etiqueta N-terminal con la proteasa PreScission.

[00388] Para preparar el complejo TSLP-Fab , se añadió un exceso molar de dos veces de proteína His₆-PreSc-TSLP ("His₆" dado a conocer como (SEQ ID NO: 40)) en Tris 25 mM (pH 7.4) con NaCl 50 mM a Fab1 anti-TSLP, la muestra se concentró por ultrafiltración a aproximadamente 10 mg/ml, cargado en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño SPX 75 y se eluyó

isocráticamente en Tris-HCl 10 mM pH 7.4 con NaCl 25 mM. La fracción máxima se concentró a 9.2mg/ml mediante ultrafiltración y se sometió a exámenes de cristalización.

Cristalización y colección de datos de rayos X

5 [00389] Los cristales se cultivaron en placas de 96 pozos (placas SD2 Innovadyne) mediante goteo por difusión de calor. En detalle, 0.2µl de proteína concentrada se mezcló con 0.2µl de solución de reserva, y la caída se equilibró contra 80µl de la misma solución de reserva a 20 °C. Los experimentos se establecieron con un sistema robótico Phoenix (Art Robbins Instruments),
10 almacenado en un soporte RockImager (formulatrix) y con registro de imágenes automático.

 [00390] Para la recolección de datos de rayos X, se montó un cristal directamente en un crio-bucle y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Los conjuntos de datos de rayos-X fueron recolectados con a Fuente Swiss Light,
15 línea de luz X10SA, con un detector Pilatus Pixel, usando una radiación de rayos-X de 1.00000Å. En ambos casos, se registraron 720 imágenes de 0.25° de oscilación cada una a una distancia de cristal a detector de 345 mm y se procesaron con la versión XDS 06 de diciembre 2010, (Kabsch 1993, J Appl Crystallogr; 26: 795-800), como se implementó en APRV.

20 *Determinación de la estructura y análisis*

 [00391] La estructura de Fab1 anti-TSLP fue determinada por reemplazo molecular con el programa Phaser (McCoy, 2007, J Appl Crystallogr. 40: 658-674), usando la estructura cristalina de un fragmento de anticuerpo Fab anti-CD132 como el modelo de partida. El anticuerpo Fab anti-CD132 se
25 seleccionó sobre la base de similitud de secuencia con Fab1 anti-TSLP. Los dominios constantes y variables primeros se utilizaron como modelos de búsqueda independientes para permitir la variabilidad del ángulo de codo Fab. La estructura se refinó usando ciclos iterativos de construcción de modelos seguido por el refinamiento cristalográfico automatizado con los programas Coot
30 0.8.0 (Herramientas Cristalográficas Orientadas a Objetos; Emsley, 2010, Acta Crystallogr Sección D: Biol Crystallogr; 66:486-501) y Autobuster 2.11.5

(Bricogne, 2011, BUSTER version 2.11.2. Cambridge, Reino Unido: Global Phasing Ltd.).

5 [00392] La estructura del complejo TSLP-Fab fue determinada por reemplazo molecular con el programa Phaser, usando las estructuras refinadas del Fab 1 anti TSLP libre y de la TSLP humana determinada previamente en el laboratorio en complejo con el fragmento de Fab u otro anticuerpo. Una vez más, los dominios constantes y variables primeros del Fab1 anti-TSLP se utilizaron como modelos de búsqueda independientes. La estructura se refinó como se describió antes para el Fab libre, con Coot 0.8.0 y Autobuster 2.11.5.

10 [00393] La inspección visual de las estructuras cristalinas se realizó utilizando los programas Coot (Emsley, 2010, Acta Crystallogr Sección D: Biol Crystallogr; 66:486-501) y PyMOL (Molecular Graphics System; DeLano Scientific: Palo Alto, CA). La calidad de los modelos refinados finales se evaluó con los programas Coot y PROCHECK v3.3 (Laskowski y colaboradores, 1992, 15 J. Appl Crystallogr; 26: 283-291). Los residuos de TSLP humana que se volvieron menos accesibles a disolvente tras la unión del Fab1 anti-TSLP fueron identificados por el programa AREAIMOL del programa CCP4 suite (Computational Collaborative Project, Número 4, 1994). Los contactos intermoleculares se definieron utilizando una distancia de corte de 4.0Å y se 20 identificaron con el programa CCP4 NCONT.

Resultados

Estructura cristalina del Fab1 anti- TSLP

25 [00394] El Fab1 anti-TSLP libre y su complejo con TSLP humana se cristalizaron en placas de 96 pozos mediante el método de difusión de vapor en gotas fijas, a 19 °C. Curiosamente, las dos muestras de proteínas cristalizadas bajo las mismas condiciones de cristalización: (NH₄)₂SO₄ 0.17M, acetato de sodio 85mM pH 5.6, PEG MME 2000 al 25.5%, glicerol al 15%. Los cristales aparecieron después de 4-5 semanas y crecieron a tamaño completo dentro de pocos días.

30 [00395] El cristal Fab libre estuvo en el grupo espacial ortorrómbico P2₁2₁2₁, con una molécula Fab por unidad asimétrica. El cristal del complejo Fab-TSLP estuvo en el grupo espacial I222, con un complejo por unidad asimétrica

(Tabla 3). Ambos cristales difractados a alta resolución, y un grupo completo de datos de difracción de buena calidad y de alta redundancia podrían ser recolectados de cada uno de ellos (Tabla 3).

[00396] La determinación de la estructura por sustitución molecular se realizó utilizando una estructura de TSLP humana determinada previamente. El refinamiento con autobuster llevó a buenas estadísticas de refinamiento y geometría global (Tabla 3). Dos residuos de anticuerpo, Asp50L y ASP152L, fueron valores atípicos según Ramachandran en la estructura libre del Fab. Además de estos dos residuos, un tercer residuo de anticuerpo, Tyr103H, también fue un valor atípico Ramachandran en la estructura del complejo Fab-TSLP. Estos tres residuos tuvieron densidad electrónica bien definida y por lo tanto son auténticos valores atípicos de geometría. Digno de mención, Asp50L y Tyr103H son residuos de CDR que participan en la unión de TSLP, como se describe a continuación.

[00397] Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y cadena ligera de Fab1 anti-TSLP se proporcionan en las Figs. 1A y 1B, con las CDRs subrayadas (como se define por Kabat, 1991, Secuencias de proteínas de interés inmunológico, Publicación NIH No. 91-3242) y los residuos situados en la interfaz de anticuerpo-antígeno marcados con *.

TABLA 3 Colección de datos de rayos X y estadísticas de refinamiento

	Fab1 anti-TSLP libre	Complejo de Fab1 con TSLP humana
Colección de datos		
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	I222
a, b, c (Å)	69.05, 72.33, 113.58	77.68, 78.46, 233.23
α , β , γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
Resolución (Å)	1.85 (1.90-1.85)*	2.00 (2.05-2.00)*
R _{sym} o R _{merge}	0,044 (1,108)	0,071 (1,83)
I / σ (I)	21,4 (1,42)	16,6 (1,14)
Exhaustividad (%)	99,9 (99,8)	99,9 (99,9)
Redundancia	6,6 (6,2)	6,6 (6,4)
Refinamiento		

Resolución (Å)	37,00-1,85	40,00-2,00
No. reflexiones	49.249	48.502
R _{work} / R _{free}	0.201 / 0.222	0.194 / 0.214
No. de átomos		
Proteína	3.245	4.042
Iones de sulfato	0	3x5
Waters	213	195
Factors B (Å ²)		
Cadena ligera de Fab (cadena L)	45.7	52.4
Cadena pesada de Fab (cadena H)	48.3	48.5
TSLP (cadena T)	-	98.5
Waters (cadena W)	51.4	53.1
Desviaciones r.m.s		
Longitudes de enlace (Å)/ángulos (°)	0.009 / 1.05	0.010 / 1.07
Nota: (*) Los números entre paréntesis corresponden a el recubrimiento de alta resolución.		

La estructura cristalina del Fab1 anti-TSLP en complejo con TSLP humana

[00398] La secuencia de aminoácidos de TSLP humana recombinante utilizada en este ejemplo (SEQ ID NO: 38) se proporciona en la Fig. 2. TSLP humana madura comenzó desde Tyr29. El constructo utilizado en la presente tuvo una etiqueta de hexahistidina N-terminal (SEQ ID NO: 40) (residuos 15-20) seguido de un sitio de reconocimiento de HRV-3C proteasa (PreScission) (residuos 21-28) y residuos 11-14 resultantes de la clonación. Asn64 y Asn119 fueron posibles sitios de glicosilación ligada a N; y los residuos 127-130 constituyeron el potencial sitio de escisión de furina (RRKR, SEQ ID NO: 39). Los elementos de la estructura secundaria se muestran debajo de la secuencia de aminoácidos: los cuadros representan las hélices alfa A, B, C y D, y las líneas gruesas representan las regiones de bucle.

[00399] TSLP no muestra ninguna similitud de secuencia de aminoácidos importante con otros miembros de la superfamilia de citoquinas IL-2. Sin embargo, TSLP se plegó como un haz de cuatro hélices con topología de arriba-arriba-abajo-abajo, como IL-2, IL-7, y muchas otras citoquinas (Fig. 7). La

hélice α_A tuvo una fuerte torcedura cerca de su centro, alrededor de la posición de Thr46. Las hélices α_B y α_C fueron bastante cortas con sólo tres vueltas a cada una; y la hélice α_D C-terminal fue más larga con casi cinco vueltas (Fig. 7). Tres disulfuros (Cys34-Cys110, Cys69-Cys75, Cys90-Cys137) estabilizan este haz de
5 cuatro hélices de cadena corta. Sin embargo, las dos conexiones entre α_A y α_B , y α_C y α_D fueron ampliamente desordenadas y no se observaron en esta estructura cristalina. Tres aminoácidos del bucle α_B - α_C y los últimos cinco residuos terminales de carboxilo también faltaron en la estructura refinada final. El sitio de escisión de furina potencial y los sitios de N-glicosilación se encuentran
10 dentro de las conexiones faltantes.

[00400] Una vista global de la estructura tridimensional del complejo Fab-TSLP se muestra en la Fig. 7.

[00401] El Fab1 anti-TSLP se unió principalmente a la hélice α_A de TSLP, que corrió a través de la ranura poco profunda revestida por H-CDR1 y CDR2 H en un lado, y por H-CDR3 y L-CDR3 en el otro lado. El pliegue
15 pronunciado de la hélice α_A ocupó la parte central de la ranura. Las hélices flanqueantes α_C y α_D y los primeros cuatro residuos del bucle α_A - α_B contribuyeron con contactos adicionales al anticuerpo.

[00402] La formación del complejo Fab-TSLP ocultó
20 aproximadamente 1700Å² de la superficie accesible al disolvente combinado, con 25 residuos de aminoácidos Fab y 25 residuos aminoácidos TSLP experimentando una reducción en su superficie accesible al disolvente tras la formación de complejos. Entre ellos, 20 residuos de Fab y 16 residuos de TSLP (véase la Tabla 4) estuvieron implicados en los contactos intermoleculares
25 directos, cuando se usa una distancia de corte de 4.0Å. La estadística de forma de complementariedad Sc (Lawrence y Colman, 1993, J. Mol Biol; 234: 946-50) igualó 0,72, un valor relativamente alto para un complejo anticuerpo-proteína (Sundberg y Mariuzza de 2003, Adv Protein Chem; 61: 119- 60). Todas las seis CDRs de Fab1 anti-TSLP contribuyeron a la unión a TSLP. Por otra parte, seis
30 aguas bien definidas ubicadas en la interfaz de antígeno-anticuerpo median las interacciones de unión.

TABLA 4. Residuos de epítomos y paratopos

Epítopo TSLP		Paratopo Fab1 anti-TSLP	
Elemento estructural	Residuos de contacto	Residuos de contacto	Elemento estructural
α_A	Lys38	Thr28H	H-CDR1
	Ala41	Tyr32H	H-CDR1
	Leu44	Tyr103H, Ile102H, Tyr48L	H-CDR3, L-CDR2
	Ser45	Asp31H, Tyr32H	H-CDR1
	Thr46	Asp56H	H-CDR2
	Ser48	Tyr103H	H-CDR3
	Lys49	Trp33H, Glu101H, Tyr103H, Tyr104H, Tyr105H	H-CDR1, H-CDR3
	Ile52	Tyr103H, Tyr104H, Tyr31L, Trp92L	H-CDR3, L-CDR1, L-CDR3
	Thr53	Trp92L	L-CDR3
bucle α_A - α_B	Ser56	Trp92L	L-CDR3
	Gly57	Trp92L	L-CDR3
	Thr58	Trp92L	L-CDR3
	Lys59	Gly28L, Ser29L, Lys30L, Tyr31L, Asp50L, Asn65L	L-CDR1, L-CDR2, L-FR3
α_C	Lys101	Asp56H	H-CDR2
α_D	Gln145	Tyr103H, Tyr31L	H-CDR3, L-CDR1
	Arg149	Asn51L, Glu52L	L-CDR2

Las listas de residuos de epítomos y paratopos en contacto directo se derivaron de las coordenadas finales refinadas con el programa CCP4 NCONT, utilizando una distancia de corte de 4.0Å.

[00403] Los residuos TSLP situados en la interfaz de unión se identificaron a partir de las coordenadas cristalográficas mediante el cálculo de (i) contactos intermoleculares entre átomos distintos de hidrógeno de menos de 4.0Å, y (ii) reducción en la superficie accesible al disolvente tras la formación de complejos. Los resultados se muestran gráficamente en la Fig 8, y una vista de anticuerpos del epítopo TSLP se proporciona en la Fig. 9. Como puede verse en

estas dos figuras, la hélice α_A , junto con los primeros cuatro residuos del bucle α_A - α_B , formaron el núcleo del epítipo, y contribuyeron en 82% del número total de contactos intermoleculares y de la superficie oculta accesible al solvente sobre la TSLP. Por otra parte, la gran mayoría de los residuos clave de epítopos
5 se encontraron en esta región: Lys49, Ile52, Gly57 y Lys59. En comparación, las helices α_C y α_D contribuyeron con muy pocos residuos de epítopos: Lys101 (α_C), Gln145 y Arg149 (α_D).

[00404] Todas las seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de Fab1 anti-TSLP contribuyeron a la interfaz de
10 unión, como se evidencia por una reducción en su superficie accesible al disolvente después de la unión al antígeno y sus contribuciones para dirigir los contactos intermoleculares (Figs. 10A y 10B). Además, Asn65L de la tercera región marco de la cadena ligera (L-FR3) también se encuentra en la interfase de unión al antígeno, pero sólo hizo una débil interacción de unión a H (3.6Å) a
15 Lys59 de TSLP.

[00405] El bucle H-CDR3 desempeñó un papel particularmente importante. Glu101H hizo la interacción crítica sal-puente con Lys49 de TSLP, y las tres tirosinas consecutivas situadas en la punta del bucle, Tyr103H, Tyr104H y Tyr105H, contribuyeron en conjunto al 58% de los contactos
20 realizados por toda la cadena pesada. Trp33H de H-CDR1 y Asp56H de H-CDR2 también fueron importantes residuos paratopos, que contribuyeron a la unión de Lys49 y Lys101 de TSLP, respectivamente.

[00406] Trp92L fue el único residuo de L-CDR3 que hizo contacto directo con el antígeno. Este residuo se encuentra en la punta de la L-CDR3 y
25 no adoptó una conformación definida en la estructura cristalina del Fab1 anti-TSLP libre. En el complejo de TSLP, sin embargo, la cadena lateral tuvo una densidad electrónica bien definida, e hizo amplios contactos con el bucle α_A - α_B , su contribución asciende a un 42% de los contactos realizados por toda la cadena ligera. Asp50L de L-CDR2 y Tyr31L de L-CDR1 fueron otros dos residuos
30 paratopos importantes proporcionados por la cadena ligera. El primero hizo una muy breve interacción electrostática (2.8Å) con Lys59 de TSLP. El último

contribuyó con las interacciones de unión con Ile52, Lys59, y Gln145 de TSLP, y también estabilizó la conformación unida del bucle H-CDR3 a través de interacciones π - π con Tyr103H y Tyr104H.

Modo de acción de Fab1 anti-TSLP

5 [00407] La señalización de TSLP requiere el montaje de un complejo ternario que comprende TSLP, la cadena de TSLPR cognada y la cadena de IL-7R α compartida. La formación del complejo binario TSLP-TSLPR es un requisito previo para incluir la cadena IL-7R α . El complejo TSLP humana-Fab1 se superpone sobre el complejo ternario TSLP de ratón-TSLPR-IL-7R α , basado en
10 todos los átomos TSLP C α . La superposición estructural demostró que el Fab1 anti-TSLP bloqueó la unión de TSLP tanto a TSLPR como a IL-7R α . la hélice α A de TSLP fue el elemento central del epítipo Fab1 anti-TSLP (Fig. 11B), y esta hélice también jugó un papel central en la unión a ambos TSLPR e IL-7R α (Fig. 11A). Además, la hélice α C estuvo involucrada en la unión a IL-7R α y la hélice α D
15 fue parte de la interfaz de unión a TSLPR. Dado que estas dos hélices también contribuyeron al epítipo Fab1 anti-TSLP la interferencia estérica entre Fab1 anti-TSLP y las dos cadenas receptoras fue extensa. El anticuerpo de cadena ligera se superpuso ampliamente con el dominio D2 de la TSLPR, mientras que el de cadena pesada se sobrepuso con el dominio D2 de IL-7R α y también con
20 algunos de los bucles de unión de citocina del dominio D1 (FIG. 11C). Los datos demostraron que el Fab1 anti-TSLP neutralizó TSLP por barrido de la citoquina y la prevención de su unión al receptor de TSLPR, bloqueando así la formación del complejo de señalización de alta afinidad con IL-7R α .

 [00408] En resumen, se determinaron las estructuras cristalinas de
25 alta resolución del Fab1 anti-TSLP en estado libre o en complejo con la TSLP humana replegada recombinante. El Fab1 anti-TSLP se encontró que se une principalmente a la hélice α A (residuos de aminoácidos Lys 38 a Thr 53) de TSLP humana, con pocas pero importantes contribuciones por las hélices α C (Lys101) y α D (Gln145, Arg149) y por el bucle (residuos de aminoácidos Ser 56 a Lys 59).
30 Una superposición estructural de TSLP humana en complejo con Fab1 anti-TSLP sobre el complejo de TSLP de ratón publicada con los dominios extracelulares de IL-7RA y TSLPR mostró que Fab1 anti-TSLP compite tanto con IL-7RA como

TSLPR por la unión de TSLP. TSLP unida con Fab1 anti-TSLP no puede unir a TSLPR y el reclutamiento del receptor de IL7R□□ también se inhibe debido al amplio impedimento estérico entre el Fab y el receptor de IL-7□.

Ejemplo 10: Proceso de pulverización y formulación de Fab1 anti-TSLP

5 Equipos y Operaciones de Purverización

[00409] Se utilizó un pulverizador específico para pulverizar una materia prima. La configuración del pulverizador comprende un atomizador de una única boquilla de doble flujo, una cámara de secado, un cicló, un adaptador, una válvula de aislado y un recolector de 1 litro en una camisa de temperatura controlada. En las modalidades descritas en el presente documento, el proceso de pulverización puede incluir un proceso de atomización, un proceso de secado, y un proceso de recolección de partículas.

[00410] Un proceso de atomización de ejemplo puede incluir los siguientes pasos: (A1) un fluido de materia prima formulada puede administrarse a través de una bomba peristáltica (Watson Marlow) a una tasa de flujo controlada hacia un atomizador asistido por aire de boquilla sencilla montado en el pulverizador; (A2) aire seco comprimido con una tasa de flujo controlada se administra a una boquilla de gas concéntrica convergente; y (A3) la expansión del aire en la punta de la boquilla atomiza la corriente de materia prima en un atomización de gotas finas.

[00411] El proceso de secado puede incluir los siguientes pasos: (B1) el aire de secado calentado con un calentador eléctrico se administra a la cámara de secado a una temperatura determinada y una tasa de flujo controlada; (B2) el aire de secado caliente interactúa con el spray de gotas finas de la Etapa A3. El disolvente (agua) en las gotitas se evapora, dando como resultado partículas sólidas; y (B3) y las partículas y vapor/aire no disolvente salen de la cámara de secado a una temperatura predeterminada.

[00412] El proceso de recolección de partículas puede incluir los siguientes pasos: (C1) las partículas y el vapor/aire no disolvente de la Etapa B3

entran en el ciclón a gran velocidad tangencial; (C2) las partículas se separan de la mezcla de aire por la fuerza centrífuga y se recogen en la parte inferior del ciclón en un recipiente de recolección de temperatura controlada; y (C3) el vapor/aire no disolvente de escape pasa a través de un filtro y rejillas de ventilación a la atmósfera dentro del aislador.

Proceso y formulación de los polvos respirables de Fab1 anti-TSLP

[00413] Esta parte proporciona una formulación y proceso de pulverización utilizados para preparar polvos respirables que comprenden partículas de Fab1 anti-TSLP formulados con diversos excipientes. Esto implicó la pulverización de una materia prima acuosa de una sola fase que comprende la proteína (Fab1 anti-TSLP) y los excipientes que funcionan principalmente bien sea como agentes mejoradores de dispersabilidad (por ejemplo, trileucina) o agentes formadores de la matriz (por ejemplo, sacáridos, sales de agente tampón). El pH de la materia prima se controló con un agente tampón de histidina-HCl a un pH específico de pH 5.0 - pH 5.5. Mediante la aplicación de principios de ingeniería de partículas, se seleccionaron los excipientes y la composición para crear un polvo que comprendía partículas rugosas - cada uno con un núcleo de proteína estabilizada dentro de una matriz vítrea rodeada por un recubrimiento de excipiente hidrófobo que mejoró la dispersabilidad del polvo y protegió el agente activo.

TABLA 5. Formulaciones de Fab1 anti-TSLP

Lote #	Fab1 anti-TSLP	Histidina	Trehalosa	Manitol	Trileucine
	% peso/ volumen	% peso/ volumen	% peso/ volumen	% peso/ volumen	% peso/ volumen
569-38-01	80	20	0	0	0
569-38-02	90	10	0	0	0
569-38-03	60	10	30	0	0
569-38-04	60	5	20	5	10
569-38-05	40	5	35	0	20
569-38-06	40	5	30	5	20

[00414] La Figura 12 muestra las formulaciones con mayor relación de excipiente a proteína que mejoran la estabilidad fisicoquímica de Fab1 anti-TSLP y reducen la tasa de agregación de Fab1 anti-TSLP.

Formulación PulmoSol que comprende Fab1 anti-TSLP

5 [00415] Esta parte proporciona la composición de las materias primas formuladas a diferente concentración total de sólidos y contenido de trileucina para aumentar el rendimiento de fabricación y optimizar la formación de el recubrimiento. Una alta concentración de sólidos aumenta el rendimiento de la producción de polvo. En este ejemplo, el contenido de Fab1 TSLP se fija
10 en 50%, con una excepción, en comparación con el ejemplo anterior.

TABLA 6. Las formulaciones que comprenden Fab1 anti-TSLP y trileucina

Lote #	Contenido de sólido	Fab1 anti-TSLP	Histidina	Trileucine	Trehalosa	Relación molar
	% peso/volumen	% peso/peso	% peso/peso	% peso/peso	% peso/peso	Azúcar: Fármaco (g)
728-06-01	1,5%	50.0%	5,89%	20.0%	24.1%	70.4
728-06-02	2,0%	50.0%	5.89%	15.0%	29.1%	85.0
728-06-03	2,5%	50.0%	5.89%	10.0%	34.1%	99.6
728-06-04	2,0%	50.0%	5.89%	10.0%	34.1%	99.6
728-06-05	1,5%	40.0%	4.71%	20.0%	30.3%	110.6

Formulaciones que comprenden Fab1 anti-TSLP y trileucina al 15%

[00416] Esta parte destaca varias formulaciones diseñadas para dar
15 cabida a la solubilidad acuosa limitada de trileucina mientras se mantiene un pH aceptable de la materia prima y partículas resultantes. Aquí, la trileucina se disolvió en HCl acuoso y se tituló de vuelta utilizando diversos medios básicos para alcanzar el pH objetivo de la solución de materia prima (pH 5.0-pH 5.5). Aproximadamente, una relación molar 1:1 de HCl a trileucina se requiere para
20 disolver completamente la trileucina.

TABLA 7. Formulaciones que comprenden Fab1 anti-TSLP y trileucina al 15%

Lote No.	Fab1 anti-TSLP	Histidina	Trehalosa	Trileucina	Ácido, HCl	Base	
	% peso/volumen	% peso/peso	% peso/peso	% peso/peso	% peso/peso	% peso/peso	
569-60-01	50,0%	5.64%	26.8%	15.0%	2.56%	N/A	
569-60-02	50,0%	5.64%	19.4%	15.0%	2.56%	Histidina	7,40%
569-60-03	50,0%	5.64%	24.1%	15.0%	2.56%	KOH	2,69%
569-60-04	50,0%	5.64%	26.8%	15.0%	2.56%	NH ₄ OH	2,70%

5 **Ejemplo 11: Afinidades de Unión del Fab1 anti-TLSP a Proteínas TSLP Humanas y Cyno Determinadas por la Titulación de Equilibrio de Solución (SET)**

[00417] Se realizaron mediciones de titulación de equilibrio de solución (SET) para determinar las afinidades de unión de Fab1 anti-TSLP a las
 10 proteínas TSLP humanas y cyno. El Fab se incubó a una concentración constante con diluciones en serie de los respectivos antígenos. La afinidad de unión se extrajo a partir de una curva de competición que se generó por el trazado de la lectura de la concentración de anticuerpo no unido frente a la concentración del antígeno aplicado. Fab1 Anti-TSLP mostró afinidades de unión
 15 en el rango picomolar bajo (pM) para todas las proteínas TSLP humanas y Cyno.

Procedimiento de ensayo

[00418] Veintidós diluciones seriales de 1.6ⁿ de la TSLP humana (producida en células HEK) y antígenos TSLP cyno se prepararon en agente tampón de muestra y se añadió una concentración constante de Fab1. Un
 20 volumen de 60 µl/pozo de cada mezcla de antígeno-Fab se distribuyeron por duplicado a una placa de microtitulación de polipropileno de 384 pozos (MTP). El agente tampón de muestra sirvió como control negativo y una muestra que

contenía sólo Fab1 como control positivo (Bmax). La placa se selló y se incubó durante la noche (al menos 16 h) a temperatura ambiente (RT) en un agitador.

[00419] Un arreglo MTP de 384 pozos MSD fue recubierto a 4°C con 30 µl de hsTSLP/pozo (producido en E. Coli) diluido en PBS a 5 µg/ml, luego
5 lavado tres veces con 70 µl/pozo de buffer de enjuague y bloqueado con 50 µl/pozo de buffer de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente en un agitador. Después del lavado, un volumen de 30µl/pozo de la mezcla de antígeno-Fab equilibrada se transfirió desde el MTP de polipropileno a la placa MSD revestida y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente.

10 [00420] Después de una etapa de lavado adicional, se añadieron 30 µl de anticuerpo de detección sulfo-etiquetado diluido en agente tampón de muestra a 1.8 µg/ml a cada pozo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en un agitador. La placa MSD se lavó y se añadieron 35 µl/pozo de agente tampón de lectura 1x MSD y se incubó durante 5 min a temperatura
15 ambiente. Las señales ECL se generaron y se midieron mediante el MSD Sector Imager 6000.

[00421] Se realizaron tres experimentos independientes para cada antígeno y se demostraron condiciones de ensayo estables. A partir de estos experimentos se calcularon los valores medios para las constantes de equilibrio
20 de disociación K_D y las desviaciones estándar como se muestra a continuación.

TABLA 8. Constantes de afinidad (K_D) para unión de Fab1 a proteínas TSLP humanas y cyno

FAB	Antígeno	K_D (pM)	No. de experimentos
Fab1	TSLP humana (HEK)	5.0 ± 2.0	3
Fab1	TSLP Cino	1.4 ± 0.6	3

25

Ejemplo 12: Estudio de determinación del intervalo de dosis de inhalación de dos semanas en el mono Cynomolgus

[00422] En este estudio no GLP, el objetivo fue determinar la toxicidad potencial de Fab1, un Fab de linfopoyetina estromal anti-tímica (TSLP), cuando se administra a monos cynomolgus por vía de inhalación una vez al día durante 14 días o, como una inyección intravenosa de única dosis el Día 1, seguido de un período de no dosificación de 13 días y una única dosis inhalada el Día 15. Además, se investigó el perfil farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) y la inmunogenicidad (IG) de Fab1.

10 [00423] El estudio se realizó como dos componentes separados del único estudio.

[00424] Sólo Inhalación: Polvo de Fab1 PulmoSol, Fab1 al 39.7% en PulmoSol se administró por inhalación a 3 grupos (3 machos/grupo) de monos cynomolgus en dosis diarias específicas de 1.0, 10.0 y 20.0 mg de Fab1/kg/día. Otro grupo de monos (2 machos) recibió placebo en polvo PulmoSol y sirvió como control. Un único animal macho adicional recibió solamente aire y actuó como un control de aire. Aerosoles de Fab1 PulmoSol y Placebo PulmoSol se generaron utilizando un dispositivo generador de cepillo giratorio (RBG1000). Los animales fueron expuestos a un aerosol de polvo de Fab1 PulmoSol (Grupos 3 a 5) o Placebo en polvo PulmoSol (Grupo 2) para un objetivo de 60 minutos una vez al día durante 14 días, utilizando una máscara oro-nasal de ajuste apropiado. El único animal macho del grupo 1 se expuso al aire seco filtrado únicamente durante la misma duración específica utilizando la misma configuración del equipo. Las concentraciones medias globales de aerosoles administrados de Fab1 fueron 0.036, 0.31 y 0.66 mg/L para los Grupos 3, 4 y 5, respectivamente. Las dosis administradas medias globales (totales estimadas) fueron de 1.1, 9.6 y 19.9 mg Fab1/kg/día para los grupos 3, 4 y 5, respectivamente. El diámetro aerodinámico medio de masa (DAMM) confirmó que los aerosoles generados de Fab1 fueron respirables a los monos y que la deposición pulmonar aceptable se lograría a la especie de prueba.

30 [00425] Intravenosa/Inhalación: Fab1 se administró a un grupo de 3 animales machos (Grupo 6) como una sola inyección de bolo intravenoso a

través de la vena safena en el Día 1. La dosis diana fue de 1 mg de fab1/kg. Luego los animales se dejaron en un periodo de no dosificación de 13 días antes de ser administrados con Fab1 PulmoSol en polvo, Fab1 al 39.7% en PulmoSol, por inhalación el Día 15. La dosis diana fue de 20 mg de Fab1/kg. Se generó aerosol Fab1 PulmoSol utilizando un dispositivo generador de cepillo giratorio (RBG1000). Los animales fueron expuestos a un aerosol en polvo de Fab1 PulmoSol durante un periodo específico de 60 minutos en una única ocasión, utilizando una máscara oro-nasal de ajuste apropiado. Luego los animales fueron retenidos durante 6 días antes de ser sacrificados el día 21. La concentración de aerosol media administrada general de Fab1 fue 0.60 mg/L. La dosis total estimada media administrada global fue de 16.3 mg de Fab1/kg/día. El diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) confirmó que el aerosol Fab1 generado fue respirable por los monos y que la deposición pulmonar aceptable se lograría para la especie de prueba.

[00426] Los siguientes parámetros y objetivos se evaluaron en este estudio: signos clínicos, peso corporal, cambios de peso corporal, parámetros de patología clínica (hematología, coagulación y química clínica), bioanálisis para concentraciones Fab1 y TSLP y parámetros toxicocinéticos (suero, fluido de lavado broncoalveolar (BAL), extractos de tejido pulmonar), anticuerpos anti-Fab1 (suero y fluido BAL), resultados primarios de la necropsia, pesos de los órganos y exámenes histopatológicos (Grupos 1 a 5 solamente).

[00427] La administración de Fab1 durante 14 días, a través de la dosificación de inhalación, resultó en cambios aparentes dentro de la cavidad nasal (aumento de las células mucosas en el epitelio respiratorio), pulmones (acumulación de macrófagos alveolares difusos, celularidad linfoide bronquiolo-alveolar aumentada e infiltración de células inflamatorias alveolares mixtas) y ganglios linfáticos bronquiales (aumento de la celularidad general) de monos cynomolgus macho. Estos cambios fueron evidentes en animales de todos los grupos tratados. La gravedad de los resultados fue mínima a leve en todos los casos y las observaciones no se consideraron adversas.

[00428] En general, la exposición a Fab1 se demostró en todos los animales tratados con Fab1 con base en los datos de concentración en suero,

extractos broncoalveolares (BAL) y de pulmón; mientras que no se detectó Fab1 en ninguna de las muestras de los animales de control de PulmoSol de placebo o aire. La biodisponibilidad se calculó que fue aproximadamente 0.2% después de la dosis de inhalación el día 15. Los anticuerpos anti-Fab1 en el suero se detectaron sólo en un animal del grupo 4 en pre-dosis el Día 1 y un animal del grupo 5 el día 14, pero se considerará que las señales observadas no tuvieron impacto aparente sobre la exposición a Fab1 en estos animales. En general no se detectó inmunogenicidad abierta a Fab1 en el estudio. TSLP total no se detectó en el suero, BAL o tejido pulmonar en la mayoría de las muestras, excepto para algunas señales muy bajas detectadas en las primeras muestras de lavado (recogidas durante el procedimiento BAL a partir de tres animales tratados con Fab1).

[00429] En conclusión, la administración de Fab1 a 3 monos cynomolgus como una única inyección en bolo intravenosa el día 1, seguido de un período de no dosificación de 13 días y una única dosis inhalada el Día 15 no dio lugar a efectos adversos. La administración por inhalación de Fab1 al mono Cynomolgus durante 14 días se asoció con cambios aparentes dentro de la cavidad nasal, los pulmones y los ganglios linfáticos bronquiales de los animales de todos los grupos tratados. La gravedad de los resultados fue mínima a leve en todos los casos y las observaciones no se consideraron adversas. Todos los animales que recibieron Fab1 fueron expuestos sistémicamente al ítem de ensayo.

Ejemplo 13: Estudio de toxicidad por inhalación de trece semanas en monos cynomolgus

[00430] Los objetivos de este estudio fueron determinar la toxicidad potencial de Fab1, un Fab de linfopoyetina estromal anti-tímica (TSLP), cuando se administra por inhalación una vez al día durante al menos 92 días consecutivos (13 semanas) a monos cynomolgus, y evaluar el potencial de reversibilidad de los resultados después de un período de recuperación de 42 días (6 semanas). Además, se determinaron las características toxicocinéticas e inmunogénicas de Fab1.

[00431] Se administró Fab1 PulmoSol en polvo por inhalación a 3 grupos (3 machos/grupo) de monos cynomolgus en dosis diarias específicas de 3, 10 y 22 mg/kg/día. Otro grupo de monos (3/sexo) recibió placebo de PulmoSol en polvo y sirvió como control. Dos animales más (2/sexo) en los grupos de placebo y de 22 mg/kg/día se mantuvieron en el estudio durante un periodo de recuperación de 6 semanas. Aerosoles de Fab1 PulmoSol y Placebo PulmoSol se generaron utilizando un dispositivo generador de cepillo giratorio (RBG1000). Los animales fueron expuestos a un aerosol de polvo de Fab1 PulmoSol (Grupos 2 a 4) o Placebo en polvo PulmoSol (Grupo 1) durante un periodo específico de 60 minutos una vez al día durante 92 días consecutivos, utilizando una máscara oro-nasal de ajuste apropiado.

[00432] Se evaluaron los siguientes parámetros y objetivos en este estudio: signos clínicos, pesos corporales, cambios de peso corporal, exámenes oftalmológicos, exámenes neurológicos (incluyendo la frecuencia respiratoria), electrocardiografía, parámetros de patología clínica (hematología, coagulación, química clínica y análisis de orina), inmunofenotipado de linfocitos de sangre periférica (citometría de flujo), función inmune (respuesta de anticuerpos dependiente de células T (TDAR) a hemocianina de lapa californiana (KLH)), bioanálisis para concentraciones de Fab1 y parámetros toxicocinéticos (extractos de suero y tejido pulmonar), anticuerpos anti-Fab1 (suero), hallazgos macroscópicos de necropsia, peso de los órganos, y exámenes histopatológicos.

[00433] Las concentraciones medias globales de aerosoles administrados de Fab1 fueron 0.10, 0.33 y 0.72 mg/L para los Grupos 2, 3 y 4, respectivamente. Las dosis administradas medias logradas totales globales estimadas (sexos combinados) fueron 3.0, 10.1 y 22.2 mg/kg/día de Fab1 para los grupos 2, 3 y 4, respectivamente. El diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) confirmó que los aerosoles de Fab1 generados fueron respirables por los monos y que la exposición pulmonar aceptable se lograría para la especie de prueba.

[00434] No se observaron efectos relacionados con el ítem de prueba para ninguno de los parámetros cardiovasculares después de la administración de Fab1 a las dosis obtenidas de 3, 10 o 22 mg/kg/día.

[00435] Los resultados para las investigaciones de función inmune (TDAR) indicaron una tendencia a niveles menores de anticuerpos IgG anti-KLH a dosis obtenidas de ≥ 10.1 mg/kg/día. En el último punto de tiempo de muestreo (día de estudio 78), se observaron disminuciones de los niveles de anticuerpos de IgG e IgM anti-KLH a dosis obtenidas ≥ 3 mg/kg/día. Este efecto fue más pronunciado en los machos en todos los puntos de tiempo y en las hembras el día 78, pero menos prominente en las hembras en otras ocasiones de muestreo. La tendencia a una disminución en la respuesta anti-KLH no se consideró adversa. Los niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-KLH en animales de recuperación del Grupo 4 (22.2 mg/kg/día) fueron superiores en todas las ocasiones en comparación con los valores de recuperación de control concurrente (Grupo 1) y similares a los resultados del estudio principal de control (Grupo 1) que apoyan una recuperación de la respuesta disminuida de anticuerpos anti-KLH. La administración de Fab1 durante al menos 92 días, a través de dosificación de inhalación, produjo un aumento de la celularidad del tejido linfóide dentro de los pulmones a dosis obtenidas de 3 mg/kg/día. La gravedad del hallazgo fue mínima a leve en todos los casos y no se consideró adversa. Después de un período de recuperación de 6 semanas, el hallazgo estuvo ausente en 2/4 (50%) de los animales de recuperación y se observó en 2/4 (50%) de los animales de alta dosis a severidad mínima. El mismo hallazgo también estuvo presente en una hembra de recuperación control (leve) confirmando que este cambio de vez en cuando se puede encontrar de forma esporádica entre animales de control. Fab1 no se detectó en ninguna de las muestras de suero o de tejido de pulmón del grupo de animales de control de Placebo PulmoSol (Grupo 1). En general, la exposición a Fab1 se demostró durante todo el período de dosificación en animales tratados con Fab1, con un aumento relacionado con la dosis tanto en suero como en tejido pulmonar. La exposición sistémica en suero también se demostró durante la recuperación de hasta 14-28 días después de la última dosis el día 92, mientras que las

concentraciones tisulares pulmonares fueron indetectables en todos los animales de recuperación realizadas en el momento de la necropsia el Día 135 (42 días después de la última dosis). Hubo una marcada acumulación en exposición sérica a Fab1 del Día de Estudio 1 al Día de estudio 91 después de dosis diarias repetidas en todos los grupos de dosis. No se observaron diferencias aparentes en exposición relacionadas con el género. Se observaron señales de anticuerpos anti-fármaco (ADA) bajas pero detectables en dos animales de control de placebo PulmoSol tanto antes de la dosis como después de la dosis, probablemente debido a anticuerpos preexistentes que no fueron específicos para Fab1. Las señales ADA no se detectaron en otros animales de control. Todos los animales tratados con Fab1 desarrollaron señales ADA después de la dosis desde el Día de estudio 28 en adelante. Las fuertes señales ADA en tres animales fueron aparentemente asociadas con la pérdida de exposición a Fab1 en el suero, pero la exposición pulmonar a Fab1 todavía se demostró en estos animales en el momento de la necropsia (1 ~ 6 horas después de la última dosis). En conclusión, la administración de Fab1 por inhalación al mono *Cynomolgus* durante 13 semanas fue bien tolerada a niveles de dosis respirables logradas de hasta 22.2 mg/ kg/día. Todos los animales que recibieron Fab1 se confirmó que tuvieron exposición a Fab1 tanto sistémicamente como en el pulmón. Los anticuerpos anti-Fab1 estuvieron presentes en todos los animales tratados desde el día 28 en adelante y se asociaron con la exposición mucho más baja en 3 individuos en comparación con el resto de los animales tratados. La evaluación microscópica confirmó mayor celularidad del tejido linfoide pulmonar para la mayoría de todos los animales tratados con Fab1, que se observó en 50% de los animales de recuperación de dosis alta después de un periodo de recuperación de 6 semanas. La severidad del hallazgo fue mínima a leve en todos los casos y no se consideró adversa.

Ejemplo 14: Preparación de formulaciones simples pulverizadas de un fragmento de anticuerpo monoclonal

[00436] El fragmento de anticuerpo monoclonal Fab1 descrito en este documento tiene un peso molecular de 46.6 kDa. Las formulaciones de polvo seco se describen para la administración pulmonar local en el tratamiento del asma. En este contexto, el uso del término "simple" se refiere a formulaciones del ingrediente farmacéutico activo (Fab1) y agente tampón solamente.

[00437] Una serie de formulaciones de anticuerpo simples que comprenden 89.5% de ingrediente farmacéutico activo y agente tampón de histidina al 10.5% se fabrican a partir de materias primas que comprenden varias composiciones disolventes de etanol/agua (Tabla 9). El contenido de etanol se varió entre 5% y 20% peso/peso. Las materias primas se pulverizaron en un pulverizador NSD con una temperatura de entrada de 105 °C, una temperatura de salida de 70 °C, una tasa de flujo de gas de secado de 595 L/min, una tasa de flujo de gas atomizador de 20 L/min, una tasa de administración de líquido de 8.0 mL/min, y un ALR de 2.5×10^3 volumen/volumen. El contenido de sólidos se fijó en 2% peso/volumen.

TABLA 9. Impacto de los parámetros del proceso en las propiedades micromeríticas de formulaciones de anticuerpos simples que comprenden el API al 89.5% en agente tampón de histidina.

Lote #	API (% peso/peso)	Trileucina (% peso/peso)	Sólidos (% peso/volumen)	EtOH (% peso/peso)	PPSD (μm)			Densidad al compactar (g/cm^3)
					x10	x50	x90	
761-22-07	89.5	0	2	0	0.55	1.34	3.24	0.347
761-02-09	89.5	0	2	5	0.66	1.93	5.64	0.178
761-02-06	89.5	0	2	10	0.73	2.48	7.19	0.142
761-02-07	89.5	0	2	20	0.69	1.94	6.04	0.135

Ejemplo 15: Propiedades Micromeríticas de formulaciones de anticuerpos simples pulverizados

[00438] Las propiedades micromeríticas de las formulaciones de anticuerpos pulverizados del Ejemplo 14 se presentan en la Tabla 9. Todas las formulaciones simples que comprenden simplemente API y agente tampón, produjeron partículas con una superficie de la partícula suave (es decir, sin corrugación de superficie). La adición de pequeñas cantidades de etanol a la materia prima acuosa redujo el volumen y densidad al compactar de los polvos, (observados también para formulaciones de insulina). Las partículas también fueron relativamente grandes en términos de su distribución de tamaño de partículas primarias (PPSD).

Ejemplo 16: Desempeño de aerosol de formulaciones pulverizadas simples de anticuerpo

[00439] La DD y TLD determinadas para los polvos delineados en el Ejemplo 15 se presentan en la Tabla 10. Las partículas primarias tuvieron un diámetro aerodinámico medio calculado, D_a , entre 0.71 y 0.93 μm (calculado a partir de mediciones de densidad al compactar y x50 usando la ecuación:

$$d_a = d_g \sqrt{\rho_p} \text{).}$$

[00440] El inhalador de polvo seco Concept1 es un dispositivo basado en la cápsula de baja resistencia ($R = 0.07 \text{ cm H}_2\text{O}^{1/2} / (\text{L/min})$).

TABLA 10. Desempeño de aerosol de formulaciones de anticuerpo simple. El rendimiento del aerosol se evaluó con el inhalador Concept1 (masa de llenado 20 mg) a una tasa de flujo de 90 L/min y un volumen total de 2L (n = 5).

Lote #	Densidad al compactar (g/cm ³)	x50 (μm)	D _a (calc) (μm)	Morfología	DD (% ND)	TLD (% DD)
761-22-07	0.347	1.34	0.79	Suave	64.9	65.0
761-02-09	0.178	1.93	0.81	Suave	77.0	57.1

761-02-06	0.142	2.48	0.93	Suave	81.2	43.7
761-02-07	0.135	1.94	0.71	Suave	74.3	57.7

[00441] Es evidente a partir de los datos de la Tabla 10 que la disminución de la densidad por sí sola es insuficiente para permitir la formación de partículas que desvían de manera efectiva la deposición en la boca y garganta. Con el fin de lograr esto, la morfología de las partículas debe ser modificada para aumentar la rugosidad de la superficie (corrugación), y serían deseables disminuciones del tamaño de partículas primarias.

[00442] Es interesante observar que mientras los péptidos y proteínas pequeñas adoptan de forma natural una morfología ondulada en ausencia de un excipiente formador de recubrimiento, la formulación del anticuerpo requiere la adición de un excipiente formador de recubrimiento para permitir la formación de partículas corrugadas. En este sentido, el excipiente formador de recubrimiento y la adición de etanol realizan funciones similares en la modificación del espesor de la pared y la densidad de las partículas pulverizadas. Por lo tanto el impacto de la adición de etanol es más pequeño en presencia de un formador de recubrimiento.

Ejemplo 17: Preparación y propiedades micromeríticas de las formulaciones pulverizadas de plataforma del anticuerpo

[00443] En esta serie de polvos pulverizados, las condiciones de pulverización se mantuvieron constantes, y el impacto de la adición de un excipiente formador de recubrimiento (es decir, trileucina, 0-15% peso/peso) se evaluó para las formulaciones de anticuerpos. Estas formulaciones también contienen trehalosa como formador de la matriz (aproximadamente 29 a 44% peso/peso en función del contenido de trileucina) y agente tampón de histidina (5.9% peso/peso, pH 5.0).

[00444] Los polvos se pulverizaron en el pulverizador NSD con una temperatura de entrada de 105 °C, una temperatura de salida de 70 °C, una tasa de flujo de gas de secado de 595 L/min, una tasa de flujo de gas atomizador de

25 L/min, una tasa de administración de líquido de 10.0 mL/min, y un ALR de 2.5 x10³ volumen/volumen. El contenido de sólidos se mantuvo constante en 2% peso/peso. Todos los polvos tuvieron una morfología corrugada con la excepción del lote 761-02-12, que fue pulverizado en ausencia de un formador de recubrimiento y produjeron partículas lisas similares a las observadas en el Ejemplo 16. Los resultados se muestran en la Tabla 11. En algunas modalidades, la formulación de polvo seco de la presente invención comprende partículas de núcleo recubierto que comprenden: un excipiente formador de el recubrimiento, y un núcleo que comprende el API, excipientes formadores de la matriz, y un agente tampón, a veces también conocido en la presente como la formulación de plataforma.

TABLA 11. Impacto de los parámetros del proceso sobre las propiedades micromeríticas de formulaciones de anticuerpos de plataforma que comprenden el API al 50.0% peso/peso, agente tampón de histidina al 5.9%, trehalosa y trileucina.

Lote #	API (% peso/peso)	Trileucina (% peso/peso)	EtOH (% por peso)	PPSD (µm)			Densidad al compactar (g/cm ³)
				x10	x50	x90	
728-06-04	50.0	10.0	0	0.55	2.28	5.14	0.366
728-06-02	50.0	15.0	0	0.64	2.06	4.83	0.197
761-02-12	50.0	0.0	10	0.48	1.60	4.87	0.158
761-22-06	50.0	5.0	10	0.50	1.63	3.85	0.268
761-02-11	50.0	10.0	10	0.63	2.25	5.75	0.176
761-02-10	50.0	15.0	10	0.67	2.30	5.27	0.112

Example18: Rendimiento del aerosol de formulaciones pulverizadas de anticuerpo de "plataforma" con un contenido variable de trileucina

[00445] La DD y TLD determinadas para los polvos descritos en el Ejemplo 17 se presentan en la Tabla 12.

TABLA 12. Impacto de los parámetros del proceso sobre las propiedades micromeríticas y rendimiento del aerosol de las formulaciones de anticuerpos de plataforma. El rendimiento del aerosol se evaluó con el inhalador Concept1 (masa de llenado 20 mg) a una tasa de flujo de 90 L/min y un volumen total de 2L (n = 5).

Lote #	Etanol/ Sólidos	Densidad al compactar (g/cm ³)	x50 (µm)	D _a (calc) (µm)	Morfología	DD (% ND)	TLD (% DD)
728-06-04	0	0.366	2.28	1.38	Corrugado	90.0	83.3
728-06-02	0	0.197	2.06	0.91	Corrugado	90.0	80.0
761-02-12	5	0.158	1.60	0.64	Suave	69.0	66.2
761-22-06	5	0.268	1.63	0.84	Corrugado	89.2	79.1
761-02-11	5	0.176	2.25	0.94	Corrugado	92.3	84.8
761-02-10	5	0.112	2.30	0.77	Corrugado	93.1	83.0

[00446] Mejoras significativas en DD y TLD se observan para las formulaciones de anticuerpos con una morfología de partículas corrugada. En modalidades de la invención, los resultados deseados de morfología corrugada a partir de la presencia de trileucina excipiente formadora de recubrimiento sobre la superficie de partículas.

[00447] En modalidades de la invención, las propiedades fisicoquímicas del material en la superficie de las partículas influyen sobre la morfología de las partículas. Para proteínas de gran tamaño (tales como ciertas proteínas por encima de 20.000 Daltons) un excipiente de formación de recubrimiento tal como trileucina se prefiere para lograr la morfología deseada. En modalidades de las partículas de la invención que forman la formulación y composición tienen una morfología corrugada para reducir las fuerzas cohesivas entre las partículas, de manera que el tamaño de los aglomerados es suficientemente pequeño para que los aglomerados sean respirables.

[00448] Cuando se añade etanol, se disminuye la densidad de las partículas de (en caso contrario) partículas corrugadas mediante la disminución del espesor de pared. Esto, a su vez, disminuye la densidad al compactar permitiendo partículas primarias más pequeñas de acuerdo con las propiedades

aerodinámicas deseadas. En algunas modalidades las partículas deben tener una densidad baja, de tal manera que las partículas primarias, y los aglomerados, sean respirables.

[00449] Se observan reducciones significativas en densidad compactada para formulaciones pareadas 728-06-04 y 761-02-11 y 728-06-02 y 761-02-10 cuando el contenido de etanol se aumenta de 0% a 10% peso/peso. Para las formulaciones específicas en este ejemplo, la adición de etanol al 10% solo no proporcionó la mejora objetivo en el rendimiento del aerosol sobre lo que se proporcionó por el excipiente formador de recubrimiento. El TLD es excelente (> 80% de la DD), pero sigue siendo inferior a la meta deseada de 90% peso/peso de la DD, en gran parte debido a que las partículas son demasiado grandes y densas. Para las partículas corrugadas el diámetro aerodinámico calculado primario, D_a , oscila de 0.77 a 1.38 micras.

15 **Ejemplo 19: Impacto de parámetros de proceso modificados (contenido de sólidos y adición de co-disolvente) sobre las propiedades micromeríticas de formulaciones de anticuerpos plataforma**

[00450] Las formulaciones que comprenden API al 50.0% peso/peso, agente tampón de histidina al 5.9% peso/peso (pH 5.0), trehalosa al 14% o 29% peso/peso aproximadamente y trileucina al 15% o 30% peso/peso aproximadamente. Los polvos se pulverizaron en un pulverizador NSD con una temperatura de entrada de 105 °C, una temperatura de salida de 70 °C, una tasa de flujo de gas de secado de 595 L/min, una tasa de flujo de gas atomizador de 30 L/min, una tasa de administración de líquido de 4.0 mL/min, y un ALR de 7.5 x10³ volumen/volumen. El contenido de sólidos se redujo a 1% peso/peso. Estas modificaciones en el proceso pulverización fueron diseñadas para reducir el tamaño de partículas primarias. En modalidades de la invención, se observaron reducciones significativas en la distribución de tamaño de partícula primaria.

TABLA 13. Impacto de los parámetros del proceso sobre las propiedades micromeríticas de formulaciones de anticuerpos de plataforma que comprenden el API al 50.0% peso/peso, agente tampón de histidina al 5.9%, trehalosa y trileucina.

Lot e #	API (% peso/pes o)	Sólidos (%) peso/volum e n)	Trileucin a (%) peso/pes o)	EtO H (% por peso)	PPSD (μm)			Densida d al compact ar (g/cm ³)
					x10	x50	x90	
761 -22- 01	50.0	1.0	15.0	5	0.3 9	1.3 3	2.5 9	0.282
761 -22- 02	50.0	1.0	15.0	10	0.5 1	1.3 1	2.5 9	0.232
761 -22- 03	50.0	1.0	15.0	20	0.5 3	1.3 6	2.9 4	0.151
761 -02- 04	50.0	1.0	15.0	30	0.5 5	1.4 4	3.1 5	0.162
761 -22- 05	50.0	1.0	30.0	20	0.6 4	1.5 8	2.9 4	0.122

5

Ejemplo 20: Impacto de parámetros de proceso modificados (contenido de sólidos y adición de co-disolvente) sobre el desempeño del aerosol de formulaciones de anticuerpos de plataforma

[00451] El impacto de las reducciones en el contenido de sólidos y
10 aumentos en ALR sobre el desempeño del aerosol de las formulaciones de
anticuerpos de plataforma se presentan en la Tabla 14. Se observaron
reducciones significativas en el diámetro aerodinámico medio de las partículas
primarias con relación a las partículas en el Ejemplo 18. Esto se traduce en TLD
entre 94% y 98% aproximadamente de la DD, es decir, dentro de un rango
15 específico deseado, preferido u óptimo de rendimiento.

TABLA 14. Impacto de los parámetros del proceso sobre las propiedades micromeríticas y rendimiento del aerosol de las formulaciones de anticuerpos de plataforma. El rendimiento del aerosol se evaluó con el

inhalador Concept1 (masa de llenado 20 mg) a una tasa de flujo de 90 L/min y un volumen total de 2L (n = 5).

Lote #	Etanol/ Sólidos	Densidad al compactar (g/cm ³)	x50 (µm)	Morfología	D _a (calc) (µm)	DD (% ND)	TLD (% DD)
761-22-01	5	0.282	1.33	Corrugado	0.71	92.4	97.8
761-22-02	10	0.232	1.31	Corrugado	0.63	93.9	95.1
761-22-03	20	0.151	1.36	Corrugado	0.53	92.1	95.6
761-02-04	30	0.162	1.44	Corrugado	0.58	93.7	95.0
761-22-05	20	0.122	1.58	Corrugado	0.55	95.0	93.7

[00452] A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por aquellos con experiencia en la técnica a la que pertenece la divulgación.

[00453] A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida per se, como será evidente para el experto. La referencia es hecha por ejemplo de nuevo a los manuales estándar y la técnica en general mencionada en la presente y a referencias adicionales citadas en la misma.

[00454] A menos que se indique lo contrario, cada una de las referencias citadas en la presente se incorpora en su totalidad como referencia.

[00455] Las reivindicaciones a la invención no son limitantes y se proporcionan a continuación.

[00456] Aunque los aspectos y las reivindicaciones particulares se han descrito en este documento en detalle, esto se ha hecho a modo de ejemplo para propósitos de ilustración solamente, y no se pretende que sean limitantes con respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas, o el alcance de la materia de las reivindicaciones de cualquier solicitud futura correspondiente. En particular, se contempla por los inventores que diversas sustituciones, alteraciones y modificaciones se pueden hacer a la divulgación sin apartarse del

espíritu y alcance de la descripción tal como se define por las reivindicaciones. La elección del material de ácido nucleico de partida, el clon de interés, o tipo de biblioteca se cree que es una cuestión de rutina para una persona de experiencia ordinaria en la técnica con el conocimiento de los aspectos descritos en este documento. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se considera están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que una experimentación rutinaria, muchos equivalentes de los aspectos específicos de la invención descrita en este documento. Tales equivalentes tienen el propósito de ser incluidos por las siguientes reivindicaciones. Una nueva redacción del alcance de las reivindicaciones en las solicitudes correspondientes presentadas más adelante puede deberse a las limitaciones de las leyes de patentes de diversos países y no debe interpretarse como renunciar a la materia objeto de las reivindicaciones.

15

REIVINDICACIONES:

1. Una molécula que se une específicamente a linfopoyetina estromal
tímica humana (TSLP) seleccionada de cualquiera de los siguientes:

a) una molécula que comprende:

- 5 una región determinante de complementariedad 1 de cadena pesada
(HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
una región determinante de complementariedad 2 de cadena pesada
(HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
una región determinante de complementariedad 3 de cadena pesada
10 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;
una región determinante de complementariedad 1 de cadena ligera
(LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11;
una región determinante de complementariedad 2 de cadena ligera
(LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; y
15 una región determinante de complementariedad 3 de cadena ligera
(LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13;

b) una molécula que comprende:

- una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID
20 NO: 5;
una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID
NO: 6;
una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID
NO: 3;
25 una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID
NO: 14;
una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID
NO: 15; y
una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID
30 NO: 16;

c) una molécula que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 17;

5

d) una molécula que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 25;

10 e) Una molécula que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 19;

15 f) Una molécula que comprende un paratopo que comprende al menos uno de los siguientes residuos: Thr28, Asp31, Tyr32, Trp33, Asp56, Glu101, Ile102, Tyr103, Tyr104, Tyr105 de una secuencia de cadena pesada de la SEQ ID NO: 22 o Gly28, Ser29, Lys30, Tyr31, Tyr48, Asp50, Asn51, Glu52, Asn65, y Trp92 de una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 25;

20 g) Un fragmento de anticuerpo que se une TSLP humana y comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11; 25 una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 12; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 13;

y

30 h) Un fragmento de anticuerpo que se une TSLP humana comprende: una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 6;

una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3;
una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 14;
una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 15;
y

5 una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 16.

2. Una molécula que se une específicamente a un epítipo en LA TSLP humana, en donde el epítipo comprende al menos uno de los siguientes residuos: Lys38, Ala41, Leu44, Ser45, Thr46, Ser48, Lys49, Ile52, Thr53, Ser56,
10 Gly57, Thr58, Lys59, Lys101, Gln145, y Arg149 de la SEC ID NO: 38.

3. La molécula de la reivindicación 2, en donde el epítipo que comprende al menos uno de los siguientes conjuntos de residuos de la SEQ ID NO: 38:

- (a) Lys49 y Ile52,
- 15 (b) Gly57 y Lys59,
- (c) Lys101,
- (d) Gln145 y Arg149.

4. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la
20 molécula es un anticuerpo monoclonal.

5. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la molécula es un fragmento de anticuerpo seleccionado a partir de Fab', F(ab')₂, scFv, minicuerpo, o diacuerpo.

25 6. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la molécula es un Fab.

7. La molécula de la reivindicación 6, en donde la molécula es un Fab
30 humano o humanizado.

8. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la molécula es una inmunoglobulina humana.

9. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la molécula se une a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 100 pM.

5 10. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la molécula se une a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 10 pM.

10 11. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde la molécula es de 5% a 95% aproximadamente, o 10% a 90% aproximadamente, o 15% a 85% aproximadamente, o 20% a 80% aproximadamente, o 25% a 75% aproximadamente, o 30% a 70% aproximadamente, o 40% a 60% aproximadamente, o 40 a 50% aproximadamente (peso/peso) de la composición farmacéutica.

20 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 en donde la composición comprende un agente formador de recubrimiento.

25 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 13, en donde el agente formador de recubrimiento es trileucina o leucina.

 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde la trileucina o leucina es de aproximadamente 10 a 75% (peso/peso) de la composición.

30 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15, en donde la trileucina es de aproximadamente 10 a 30% (peso/peso) de la composición, o en donde la leucina es de aproximadamente 50-75% (peso/peso) de la composición.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde la composición comprende al menos un excipiente formador de la matriz.

5 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en donde el al menos un excipiente formador de la matriz se selecciona de entre histidina, trehalosa, manitol, sacarosa, o citrato de sodio.

10 19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18, en donde el al menos un excipiente formador de la matriz se selecciona de trehalosa o una mezcla de trehalosa y manitol.

15 20. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en donde el excipiente formador de la matriz es de aproximadamente 15 a 35% (peso/peso) de la composición.

21. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 en donde la composición comprende un agente tampón.

20 22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el agente tampón se selecciona a partir de una histidina, glicina, acetato, o agente tampón de fosfato.

25 23. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, en donde el agente tampón es de aproximadamente 5 a 13% de la composición.

24. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 en donde la composición se formula como un formulación en polvo seco.

30 25. La composición farmacéutica de la reivindicación 24, en donde la composición se formula como un formulación en polvo seco apropiada para inhalación.

35 26. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde la composición comprende: partículas pulverizadas que comprenden un

recubrimiento y un núcleo, en donde el recubrimiento comprende trileucina o leucina y el núcleo comprende:

- i) la molécula, trehalosa, manitol, y un agente tampón; o
- ii) la molécula, trehalosa, agente tampón, y HCl.

5

27. La composición farmacéutica de la reivindicación 26, en donde el agente tampón se selecciona a partir de una histidina, glicina, acetato, o agente tampón de fosfato.

10

28. Una composición farmacéutica que comprende partículas pulverizadas que comprenden:

(i) un núcleo que comprende trehalosa, manitol, histidina, y una molécula de unión a TSLP, o un núcleo que comprende trehalosa, histidina, HCl, y una molécula de unión a TSLP, en donde la molécula de unión a TSLP es un
15 fragmento Fab de anticuerpo que comprende:

a) una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4

una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2

20

una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 3

una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 11

25

una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 12; y

una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 13; o

30

b) una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 5

una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 6

una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEC ID NO: 3

una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEC ID NO: 14

5 una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEC ID NO: 15; y

una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEC ID NO: 16; y

ii) un recubrimiento que comprende trileucina o leucina.

10

29. La composición farmacéutica de la reivindicación 28 que comprende:

(a) molécula de unión a TSLP al 40% (peso/peso), trileucina al 25%
(peso/peso), peso combinado de trehalosa y manitol al 30% (peso/peso), e
histidina al 5% (peso/peso);

15 b) molécula de unión a TSLP al 50% (peso/peso), trileucina al 15%
(peso/peso) , HCl al 2.6% (peso/peso), histidina al 5.6% (peso/peso), y peso
combinado de trehalosa y una base al 26.8% (peso/peso); o

c) molécula de unión a TSLP al 50% (peso/peso), trileucina al 15%
(peso/peso) , trehalosa al 19.4% (peso/peso), histidina al 13.04% (peso/peso), y
20 HCl al 2.56% (peso/peso).

30. Un kit que comprende la molécula de la reivindicación 1, o la
composición farmacéutica de la reivindicación 11, y un dispositivo para
administrar la molécula o composición farmacéutica a un sujeto.

25

31. El kit de la reivindicación 30, en el que el dispositivo libera la molécula
o composición farmacéutica en una forma de aerosol.

32. El kit de la reivindicación 30, en donde el dispositivo es un inhalador
30 de polvo seco.

33. Un método de tratamiento de una condición relacionada con TSLP en
un sujeto en necesidad del mismo, el método que comprende administrar al

sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 11-29.

5 34. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 11-29 para su uso en el tratamiento de una condición relacionada con TSLP en un sujeto en necesidad del mismo.

10 35. El uso de la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 11-29 para el tratamiento de una condición relacionada con TSLP en un sujeto en necesidad del mismo.

15 36. El uso de la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una condición relacionada con TSLP en un sujeto en necesidad del mismo.

20 37. El método de la reivindicación 33, molécula de la reivindicación 34, o usos de la reivindicación 35 o 36, en donde la afección inflamatoria relacionada con TSLP se selecciona de asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rinitis alérgica, rinosinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, esofagitis eosinofílica, y dermatitis atópica.

25 38. El método de la reivindicación 33, la molécula de la reivindicación 34, o usos de la reivindicación 35 o 36, en donde la afección inflamatoria relacionada con TSLP es asma.

30 39. El método de la reivindicación 33, la molécula de la reivindicación 34, o usos de la reivindicación 35 o 36, en donde la molécula se formula como una formulación de polvo seco adecuada para la inhalación.

40. El método de la reivindicación 33, la molécula de la reivindicación 34, o usos de la reivindicación 35 o 36, en donde la molécula se administra al sujeto por vía oral o por vía intranasal.

5 41. El método de la reivindicación 33, la molécula de la reivindicación 34, o usos de la reivindicación 35 o 36, en donde la molécula se administra al sujeto en una forma aerolizada.

10 42. El método de la reivindicación 33, la molécula de la reivindicación 34, o usos de la reivindicación 35 o 36, en donde la molécula se administra al sujeto por un inhalador de polvo seco.

43. El método de la reivindicación 33, la molécula de la reivindicación 34, o usos de la reivindicación 35 o 36, en donde el sujeto es un humano.

15 44. El método de la reivindicación 33, la molécula de la reivindicación 34, o usos de la reivindicación 35 o 36, que comprende además la administración de un segundo agente al sujeto.

20 45. El método, molécula, o el uso de la reivindicación 44, en donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides, broncodilatadores, antihistamínicos, antileucotrienos e inhibidores de PDE-4.

25 46. Un ácido nucleico que codifica la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

47. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 46.

30 48. Una célula hospedera que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 46 o el vector de la reivindicación 47.

49. Un método de producción de la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, el método que comprende:

cultivar una célula huésped que expresa un ácido nucleico que codifica la molécula; y

recolectar la molécula del medio de cultivo.

5 50. Un método para preparar una formulación de polvo seco que comprende la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, el método que comprende:

 (a) proporcionar una solución acuosa que comprende la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, trileucina o leucina, un excipiente
10 formador de la matriz, y un agente tampón;

 (b) pulverizar la solución acuosa de la etapa (a) a una temperatura en un rango entre 120 °C y 200 °C (entrada) y un rango entre 55 °C y 75 °C (salida) para producir partículas de polvo seco; y

 (c) recolectar las partículas de polvo seco.

15

 51. El método de la reivindicación 50, en el que el agente tampón se selecciona a partir de un agente tampón de histidina, glicina, acetato, o fosfato.

 52. El método de la reivindicación 50, en donde el excipiente formador de
20 la matriz se selecciona de entre histidina, HCl de histidina, trehalosa, manitol, sacarosa, o citrato de sodio.

 53. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde la relación de masa de excipiente a molécula es mayor de 0.5.

25

RESUMEN

La presente invención proporciona moléculas, ej., anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que se unen específicamente a linfopoyetina estromal tímica (TSLP), composiciones que comprenden estas moléculas, y
5 métodos de uso y producción de estas moléculas.