

ANTICUERPOS QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A TL1A

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud invoca prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. N°: 62/220.442, presentada el 18 de septiembre, 2015, cuyo contenido se incorpora por completo en la presente a modo de referencia y para todo fin.

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

Esta Solicitud incluye un Listado de Secuencias presentado en formato electrónico como un archivo de texto con el nombre TL1A_ST25, creado el 18 de septiembre, 2015, cuyo tamaño es de 89.000 bytes. El Listado de secuencias se incorpora en la presente a modo de referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta divulgación se relaciona en general con el campo de la modificación mediante ingeniería genética de anticuerpos. Más específicamente, esta divulgación se relaciona con variantes de anticuerpos que se unen específicamente a TL1A y que inhiben la interacción entre TL1A y el receptor de muerte 3 (DR3). En algunos aspectos, los anticuerpos también inhiben la interacción entre TL1A y el receptor señuelo 3 (DcR3). Los anticuerpos presentan una potencia mejorada con relación al anticuerpo parental a partir del cual derivaron las variantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En toda la Descripción se citan varias publicaciones, que incluyen patentes, solicitudes publicadas, números de acceso, artículos técnicos y artículos académicos. Cada una de estas publicaciones citadas se incorpora, por completo y para todo fin, en este documento a modo de referencia.

El ligando tipo TNF 1A (TL1A, sinónimo del miembro de la superfamilia de TNF 15 (TNFSF15); TL1 y VEGI) es un miembro de la superfamilia de factores de necrosis tumoral, que es expresado por las células presentadoras de antígenos (que incluyen células dendríticas, células B y macrófagos), células T CD4+ y CD8+ y células endoteliales. El TL1A se puede expresar sobre la superficie celular o puede ser secretado como una citoquina soluble. El receptor del TL1A, el receptor de la muerte 3 (DR3), es expresado por una variedad de células, que incluyen células T CD4+ y CD8+, células NK, células T NK y células T reguladoras (Treg) FOXP3+ y células linfoides innatas tipo 2 y tipo 3 (ILC2 e ILC3).

El TL1A también se puede unir a un receptor señuelo (DcR3), que es un inhibidor competitivo del DR3. El DcR3 también actúa como un receptor señuelo para el ligando Fas (Fas-L) y la proteína inducible tipo linfotóxica que compete con la glicoproteína D por la unión al mediador de entrada

del herpesvirus sobre las células T (LIGHT). Por lo tanto, el DcR3 es un regulador importante de varias vías de transducción de señales.

La vía de señalización TL1A/DR3 se ha relacionado con
5 varios sistemas biológicos que están asociados con enfermedades en humanos. Por ejemplo, se ha demostrado que TL1A cumplen un rol en la inmunidad, angiogénesis y homeostasis de los tejidos de barrera. También se ha demostrado que la inhibición de la interacción de TL1A con
10 DR3 promueve un beneficio terapéutico en varias condiciones mediadas por el sistema inmunológico, tal como la experimental encefalomiелitis autoinmune (EAE; un modelo de esclerosis múltiple), colitis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedades
15 de la piel, asma y artritis.

Por lo tanto, son deseables los compuestos que inhiben la actividad del TL1A, por ejemplo, por sus usos terapéuticos, profilácticos, de diagnóstico y pronóstico.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 En la presente se provee un anticuerpo recombinante que comprende una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 28,

una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 29, 5 una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 30, siempre que cuando la región variable de la cadena pesada 10 comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, entonces la región variable de la cadena liviana no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la 15 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de 20 aminoácidos de la SEQ ID N°: 21 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 20. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID N°: 16, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 23 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 24 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 25 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 26 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ

ID N°: 22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 24 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 25 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 26 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 27.

En la presente también se provee un anticuerpo recombinante que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o 1 SEQ ID N°: 3 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14, siempre que cuando la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, la región variable de la cadena liviana no comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una

región variable de la cadena pesada que comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, y una región
variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de
aminoácidos de la SEQ ID N°: 5. En algunos aspectos, el
5 anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada
que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1,
y una región variable de la cadena liviana que comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6. En algunos
aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la
10 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N°: 1, y una región variable de la cadena liviana que
comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7. En
algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable
de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
15 de la SEQ ID N°: 1, y una región variable de la cadena
liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ
ID N°: 8. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una
región variable de la cadena pesada que comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y una región
20 variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de
aminoácidos de la SEQ ID N°: 4. En algunos aspectos, el
anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada
que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3,
y una región variable de la cadena liviana que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10.

En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 60. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 61. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 60 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 61.

Dichos anticuerpos recombinantes preferiblemente son de longitud completa y preferiblemente son monoclonales. Dichos

anticuerpos recombinantes se unen a TL1A con una afinidad mejorada con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la

5 cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. Dichos anticuerpos recombinantes tienen una potencia mejorada con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región

10 variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 10 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de

15 la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 12 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende

20 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 13 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de

la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 15 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 20 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 25 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 27 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana

que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 40 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La magnitud de mejora de la potencia se puede determinar de acuerdo con un ensayo de potencia de caspasa inducida por TL1A en células TF-1.

Dichos anticuerpos recombinantes pueden comprender una región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana, una región constante de la cadena pesada de la IgG2 humana o una región constante de la cadena pesada de la IgG4 humana, o cualquier alotipo de las mismas. La región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana puede comprender la SEQ ID N°: 42 o la SEQ ID N°: 43 (IgG1 Δ K humana) o la SEQ ID N°: 44 (la IgG1 humana con YTE) o la SEQ ID N°: 64 (la IgG1 humana con YTE y Δ K) o la SEQ ID N°: 63 (la IgG1 humana con L234A, L235A, G237A) o la SEQ ID N°: 62 (la IgG1 humana con L234A, L235A, G237A y Δ K) o la SEQ ID N°: 65 (la IgG1 humana con L235A y G237A) o la SEQ ID N°: 66 (la IgG1 humana con L235A, G237A y Δ K). La región constante de la cadena pesada de la IgG2 humana puede comprender la SEQ ID N°: 67 o la SEQ ID N°: 70 (la IgG2 Δ K humana) o la SEQ ID N°: 71 (la IgG2 humana con

A330S, P331S) o la SEQ ID N°: 68 (la IgG2 humana con A330S, P331S y Δ K). La región constante de la cadena pesada de la IgG4 humana puede comprender la SEQ ID N°: 45 o a SEQ ID N°: 46 (la IgG4 humana con S228P y Δ K) o la SEQ ID N°: 47 (la
5 IgG4 humana con S228P y YTE) o la SEQ ID N°: 69 (la IgG4 humana con S228P, YTE y Δ K). Se comprenderá que se podría usar una cadena pesada de la IgG4 sin la sustitución estabilizante S228P (por ejemplo, IgG4 con YTE solamente o IgG4 con YTE y Δ K o IgG4 con Δ K solamente).

10 Los anticuerpos recombinantes pueden comprender una región constante lambda de la cadena liviana humana o un alotipo de la misma. La región constante lambda de la cadena liviana humana puede comprender la SEQ ID N°: 48.

Dichos anticuerpos recombinantes se unen a un TL1A
15 humano y se puede unir a un TL1A de un primate no humano o a un TL1A de un mamífero no humano tal como de ratón, rata, cobayo, gato, perro, conejo o cerdo.

Dichos anticuerpos recombinantes se pueden usar en un método para tratar una enfermedad de las vías respiratorias,
20 un método para tratar una enfermedad gastrointestinal, un método de tratamiento de enfermedades de la piel o un método de tratamiento de artritis, o pueden ser para su uso en el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias, una enfermedad gastrointestinal, enfermedades de la piel o

artritis, o pueden servir para su uso en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias, una enfermedad gastrointestinal, enfermedades de la piel o artritis. La enfermedad de las vías respiratorias puede comprender uno o más entre asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar, sarcoidosis pulmonar, rinitis alérgica o fibrosis quística. La enfermedad gastrointestinal puede comprender uno o más entre enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, esofagitis eosinofílica o síndrome de intestino irritable, o una enfermedad o condición gastrointestinal asociada con la fibrosis quística. La artritis puede comprender artritis reumatoide. Las enfermedades de la piel pueden comprender uno o más entre dermatitis atópica, eczema y escleroderma.

Los sujetos humanos, los sujetos primates no humanos o los sujetos de mamíferos no humanos que necesitan dichos tratamientos pueden ser tratados con los anticuerpos o con una composición que comprenda los anticuerpos, por ejemplo, mediante administración de los anticuerpos, o de una composición con los mismos, al sujeto. La administración puede ser parenteral, por ejemplo, subcutánea y/o intravenosa.

Dichos anticuerpos recombinantes se pueden usar en un

método para detectar TL1A sobre la superficie de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los métodos comprenden poner un anticuerpo que se une a TL1A, como se describe o ejemplifica en la presente, en contacto con las
5 PBMC obtenidas de un sujeto, y detectar el anticuerpo unido al TL1A sobre la superficie de dichas PBMC. Los métodos pueden comprender además cuantificar el nivel de TL1A sobre las PBMC. Los métodos pueden comprender además obtener las PBMC del sujeto.

10 Dichos anticuerpos recombinantes se pueden usar en un método para detectar TL1A en suero sanguíneo. Los métodos comprenden poner un anticuerpo que se une a TL1A, como se describe o ejemplifica en la presente, en contacto con plasma sanguíneo obtenido de un sujeto, y detectar el anticuerpo
15 unido al TL1A en el suero. Los métodos pueden comprender además cuantificar el nivel de TL1A en el suero sanguíneo. Los métodos pueden comprender además obtener suero de sangre obtenida del sujeto. Los métodos pueden comprender además obtener sangre del sujeto.

20 Se proveen los polinucleótidos que codifican una o más entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana de dichos anticuerpos. Los polinucleótidos también pueden codificar una región constante de la cadena pesada y/o una región constante de la cadena

liviana.

En algunos aspectos, un polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la

5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°: 51 o la SEQ ID N°: 58. En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que

10 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°: 50. En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que

15 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°: 52 o la SEQ ID N°: 59. En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del

20 anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°: 54. En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del

anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N°: 7, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos
que comprende la SEQ ID N°: 55. En algunos aspectos, el
polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos
5 que codifica una región variable de la cadena liviana del
anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N°: 8, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos
que comprende la SEQ ID N°: 56. En algunos aspectos, el
polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos
10 que codifica una región variable de la cadena liviana del
anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N°: 10, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos
que comprende la SEQ ID N°: 57.

En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una
15 secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región
variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, por ejemplo, una
secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°:
49. En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una
20 secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región
variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4, por ejemplo, una
secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°:
52. En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una

secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°:

5 53.En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°:

10 54.En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°:

15 55.En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID N°: 56.

20 Se proveen vectores que comprenden uno o más de dichos polinucleótidos. Además, se proveen células transformadas con uno o más de dichos polinucleótidos o dichos vectores. Las células transformadas pueden ser de mamífero y preferiblemente son células huésped de expresión en

mamíferos, tales como células CHO, células NS0 o células HEK293.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

En la Figura 1 se muestran las posiciones y las
5 identidades de cada una de las sustituciones de aminoácidos
individuales efectuadas en las regiones CDR1 o CDR2 o en
residuos de aminoácidos seleccionados adyacentes a la CDR2 de
la cadena pesada variable del anticuerpo parental (320-179).
Las regiones recuadradas representan las CDR de acuerdo con
10 el sistema de numeración AbM.

En la Figura 2 se muestran las posiciones y las
identidades de cada una de las sustituciones de aminoácidos
individuales efectuadas en las regiones CDR1 o CDR3 de la
cadena liviana variable del anticuerpo parental (320-179).
15 Las regiones recuadradas representan las CDR de acuerdo con
el sistema de numeración AbM.

En la Figura 3 se muestra un alineamiento de las cadenas
pesadas de variantes del anticuerpo anti-TL1A.

En la Figura 4 se muestra un alineamiento de las cadenas
20 livianas de variantes unión del anticuerpo anti-TL1A.

En la Figura 5 se muestra una comparación de la fase de
disociación de TL1A de variantes de anticuerpos anti-TL1A,
medida mediante SPR.

En la Figura 6 se muestran los resultados de un ensayo

de potencia de caspasas en células TF-1 con variantes de los anticuerpos anti-TL1A.

En la Figura 7 se muestran los resultados de un ensayo de potencia de caspasas en células TF-1 usando varios anticuerpos anti-TL1A en comparación con el anticuerpo parental, 320-179.

En la Figura 8 se muestra que el anticuerpo 320-587 tiene una potencia superior a TL1A en un ensayo de potencia de caspasa en células TF-1, en comparación con otros anticuerpos anti-TL1A publicados en varios experimentos diferentes.

En la Figura 9 se muestran varios anticuerpos anti-TL1A que inhiben la unión de TL1A al DR3, en comparación con un control de isotipo medido en un formato de ELISA.

En la Figura 10 se muestra que el anticuerpo parental, 320-179, no inhibe la unión de TL1A al DcR3 en tanto las variantes de anticuerpos anti-TL1A inhiben la interacción de TL1A-DcR3.

En la Figura 11 se muestra que el anticuerpo 320-587 reacciona de manera cruzada y se une al TL1A de diferentes especies; el anticuerpo se unión al TL1A de todas las especies evaluadas.

En la Figura 12 se muestran los resultados de la administración del anticuerpo 320-587 en un modelo de colitis

inducida por TNBS en rata, que demuestran que el anticuerpo alivia significativamente los síntomas de colitis.

En la Figura 13 se muestra que el anticuerpo 320-587 detecta al TL1A humano secretado por las PBMC humanas
5 estimuladas con complejos inmunes, en una prueba de ELISA.

En la Figura 14 se muestra que el anticuerpo 320-587 detecta una población de PBMC humanas que expresan al TL1A de membrana sobre sus superficies en una prueba de citometría de flujo.

10 En la Figura 15 se muestra que las ratas con asma aguda inducida por OVA que fueron tratadas con el anticuerpo 320-587 presentaban una reducción significativa de los eosinófilos en el fluido de lavaje broncoalveolar (BALF).

En las Figuras 16A a 16D se muestran mejoras debidas al
15 tratamiento con el anticuerpo 320-587 de cobayos con asma aguda inducida por OVA en (Figura 16A) eosinófilos en BALF, (Figura 16B) macrófagos en BALF, (Figura 16C) hipersensibilidad de las vías respiratorias después de una reacción asmática temprana y (Figura 16D) magnitud de una
20 reacción asmática temprana.

En las Figuras 17A a 17E se muestra que el tratamiento con anticuerpo 320-587 de ratas con asma crónica inducida por OVA presentaba mejoras en (Figura 17A) eosinófilos en BALF, (Figura 17B) macrófagos en BALF, (Figura 17C) IL-13 en BALF,

(Figura 17D) hiperplasia de células mucosas evaluada mediante reactividad a PAS y (Figura 17E) engrosamiento de la mucosa evaluado en secciones teñidas con H&E.

En la Figura 18 se muestra la dosis de ovalbúmina
5 necesaria para duplicar la obstrucción de las vías respiratorias.

En la Figura 19 se muestra que el tratamiento con el anticuerpo 320-587 de colitis inducida por TNBS en ratas mostraba mejoras de la fibrosis en el área con úlcera.

10 En las Figuras 20A a 20E se muestra una comparación de ratas con colitis inducida por TNBS y con colitis inducida por DNBS, que fueron tratadas con el anticuerpo 320-587 y los efectos a los 7 y 14 días sobre (Figura 20A) la relación de peso/longitud del colon, (Figura 20B) fibrosis del colon,
15 (Figura 20C) infiltrados en colon y (Figura 20D) daño del colon. En la Figura 20E se muestran secciones representativas de áreas con úlceras a los 7 y 14 días.

En las Figuras 21A a 21C se muestra que el tratamiento con el anticuerpo 320-587 de colitis inducida por DSS en
20 ratas presentaba mejoras en (Figura 21A) el cambio de peso durante la administración de DSS, (Figura 21B) calificación clínica durante la administración de DSS y (Figura 21C) la relación de peso/longitud colon.

En la Figura 22 se muestran cambios en las citoquinas

intraperitoneales inducidos por TL1A como respuesta al tratamiento con 320-587.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

En toda la Descripción y en las Reivindicaciones se
5 utilizarán diversos términos relacionados con los aspectos de la divulgación. Dichos términos tendrán el significado que habitualmente tienen en el arte, a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente se interpretarán de una manera coherente con la definición
10 provista en la presente.

Los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente e incluyen cualquier animal. Se prefieren los mamíferos, que incluyen mamíferos de compañía (por ejemplo, gatos, perros) y de granja (por ejemplo, cerdos, caballo,
15 vacas), así como roedores, que incluyen ratones, conejos y ratas, cobayos y otros roedores. Más preferido son los primates no humanos, tales como monos cinomolgos, y más preferidos aún son los seres humanos.

Una molécula, tal como un anticuerpo, ha sido "aislado"
20 si fue alterado y/o retirado de su entorno natural por la mano del hombre.

Tal como se usan en la presente, las formas singulares "un", "uno" y "el", "ella" incluyen los referentes en plural, a menos que expresamente se indique de otra manera.

La "especificidad" en el contexto de las interacciones de anticuerpo-antígeno no es necesariamente una denominación absoluta sino que puede ser un término relativo indicativo del grado de selectividad de un anticuerpo por una célula positiva para un antígeno en comparación con una célula negativa para un antígeno. La especificidad de un anticuerpo por una célula positiva para un antígeno está mediada por las regiones variables del anticuerpo, y habitualmente por las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo. Una construcción puede tener entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 veces de especificidad por células positivas para antígenos en comparación con las células negativas para antígenos.

Según se usa en la presente, el término "recombinante" incluye la expresión para genes obtenidas mediante ingeniería genética o mediante otra manipulación de laboratorio.

La divulgación provee variantes de los anticuerpos anti-TL1A que comprenden una región variable de la cadena pesada y/o liviana del anticuerpo 320-179 alterada de manera recombinante, donde dichas variantes de los anticuerpos se unen específicamente a TL1A. Estas variantes de los anticuerpos 320-179 inhiben la capacidad de TL1A para interactuar con el DR3 y, en algunos aspectos, también con el DcR3 y, además inhiben la señalización inducida por la

interacción de TL1A con DR3. Estos anticuerpos tienen una potencia mejorada con relación al anticuerpo 320-179. Estos anticuerpos tienen una afinidad mejorada por TL1A con relación al anticuerpo 320-179.

5 La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 10 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la
10 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 12 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la
15 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 13 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de
20 la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 15 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 20 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 25 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 27 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La potencia mejorada puede ser una potencia por lo menos 40 veces mayor aproximadamente con relación a un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La magnitud de mejora de la potencia se puede determinar, por ejemplo, midiendo la liberación de caspasa en la apoptosis inducida por TL1A en un ensayo celular con TF-1.

5 Las variantes de los anticuerpos 320-179 se expresan de manera recombinante y se unen específicamente a TL1A. El anticuerpo parental, 320-179, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana
10 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. En algunos aspectos, una variante del anticuerpo 320-179 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 o la SEQ ID N°: 3 y una región variable de la cadena liviana que
15 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14, siempre que cuando la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, la región variable de la cadena liviana no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. La variante del
20 anticuerpo 320-179 puede inhibir la interacción de TL1A con DR3. La variante del anticuerpo 320-179 tiene una potencia mejorada con relación al anticuerpo 320-179 y/o tiene una afinidad mejorada por TL1A con relación al anticuerpo 320-179.

En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4. En algunos

5 aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de

10 aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5. En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, y la región variable de la cadena liviana comprende

15 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6. En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7. En algunos aspectos, la

20 región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8. En algunos aspectos muy preferidos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4. En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6. En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7. En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8. En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10.

En aspectos muy preferidos, la variante del anticuerpo 320-179 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4, y se une específicamente a TL1A. En algunos aspectos, la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID N°: 3 está unida a

una región constante de la cadena pesada de la IgG1(Δ K) humana (por ejemplo, la SEQ ID N°: 43) de manera tal que la cadena pesada comprende la SEQ ID N°: 60. En algunos aspectos, la región variable de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 4 está unida a una región constante lambda de la cadena liviana humana (por ejemplo, la SEQ ID N°: 48) de manera tal que la cadena liviana comprende la SEQ ID N°: 61. La variante del anticuerpo 320-179 puede inhibir la interacción de TL1A con DR3. La variante del anticuerpo tiene una potencia mejorada con relación al anticuerpo 320-179 y/o tiene una afinidad mejorada por TL1A con relación al anticuerpo 320-179.

En algunos aspectos, las variantes de los anticuerpos 320-179 se expresan de manera recombinante y se unen específicamente a TL1A, y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 28 y una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17. Los anticuerpos pueden comprender una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 29, una CDR2 de la región variable de la cadena

liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 30. En los aspectos donde la región variable de la
5 cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1, la región variable de la cadena liviana preferiblemente no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. Estas variantes de los anticuerpos 320-179 pueden inhibir la interacción de TL1A con DR3. Estas
10 variantes de los anticuerpos 320-179 tienen una potencia mejorada con relación al anticuerpo 320-179 y/o tienen una afinidad mejorada por TL1A con relación al anticuerpo 320-179.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen
15 específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, una CDR3 de la región
20 variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 18, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen
5 específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, una CDR3 de la región
10 variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 23, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de
15 aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen
específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región
20 variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 24, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 25, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 18, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 20.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 26, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 22.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 18, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 24, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 25, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 21, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 26, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 22.

10 En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A y comprenden una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 21, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 17, una CDR1 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 18, una CDR2 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 19 y una CDR3 de la región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 27.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen

específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana, siempre que la región variable de la cadena liviana no
5 comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 y una región variable de la cadena liviana o una cadena
10 liviana. La región variable de la cadena liviana puede comprender además una región constante lambda.

En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos
15 de la SEQ ID N°: 2 y una región variable de la cadena pesada, siempre que la región variable de la cadena pesada no comprenda la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana
20 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4 y una región variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5 y

una región variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6 y una región

5 variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7 y una región variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los

10 anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8 y una región variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una

15 región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 9 y una región variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la

20 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10 y una región variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 11 y una región

variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 12 y una región variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13 y una región variable de la cadena pesada. En algunos aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a TL1A, y comprenden una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14 y una región variable de la cadena pesada, siempre que si la región variable de la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2, la región variable de la cadena pesada no comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1. La región variable de la cadena pesada puede comprender además una región constante de la cadena pesada, incluyendo cualquier secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de la IgG1, IgG2 o IgG4 que se describe o ejemplifica en la presente.

Las variantes del anticuerpo 320-179 se unen específicamente a TL1A. Los anticuerpos se unen al TL1A humano y se pueden unir a uno o más entre TL1A de mono

cinomolgo, TL1A de ratón, TL1A de rata, TL1A de cobayo, TL1A de gato, TL1A de perro, TL1A de cerdo o TL1A de conejo. En algunos aspectos, los anticuerpos se pueden unir al TL1A de múltiples especies diferentes, por ejemplo, si se comparte el epitope. En algunos aspectos, el TL1A humano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 31, la SEQ ID N°: 32 o la SEQ ID N°: 33. En algunos aspectos, el TL1A de mono cinomolgo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 34. En algunos aspectos, el TL1A de ratón comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 35. En algunos aspectos, el TL1A de rata comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 36. En algunos aspectos, el TL1A de cobayo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 37. En algunos aspectos, el TL1A de gato comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 38. En algunos aspectos, el TL1A de cerdo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 39. En algunos aspectos, el TL1A de conejo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 40. En algunos aspectos, el TL1A de perro comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 41.

Las variantes del anticuerpo 320-179 tienen una afinidad de unión por un epitope sobre TL1A que incluye una constante de disociación en el equilibrio (K_D), que se puede medir de acuerdo con un ensayo de exclusión cinética, tal como un

ensayo KINEXA® (Sapidyne Instruments Inc., Boise, ID).

El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética preferiblemente es menor que aproximadamente 1000 pM. En algunos aspectos, la K_D para la unión a TL1A determinada en un ensayo de exclusión cinética es menor que aproximadamente 500 pM o menor que aproximadamente 400 pM o menor que aproximadamente 300 pM o menor que aproximadamente 200 pM. En algunos aspectos preferidos, la K_D para la unión a TL1A determinada en un ensayo de exclusión cinética es menor que aproximadamente 100 pM.

El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 25 pM y aproximadamente 75 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 30 pM y aproximadamente 60 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 30 pM y aproximadamente 50 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 35 pM y aproximadamente 50 pM. El valor

de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 36 pM y aproximadamente 46 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 38 pM y aproximadamente 44 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 39 pM y aproximadamente 43 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 40 pM y aproximadamente 45 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de entre aproximadamente 35 pM y aproximadamente 42 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de aproximadamente 40 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de aproximadamente 41 pM. El valor de K_D para la unión a TL1A determinado en un ensayo de exclusión cinética puede ser de aproximadamente 42 pM. En el ensayo de exclusión cinética se puede la molécula de anticuerpo o la molécula de TL1A como miembro de unión constante y la otra molécula como titulante.

Las variantes del anticuerpo anti-TL1A 320-179 preferiblemente se pueden unir a células positivas para TL1A. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A

con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 100 nM. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 75 nM. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 50 nM. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 30 nM. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 25 nM. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 20 nM. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 18 nM. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 15 nM. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 13 nM. El anticuerpo se puede unir a una célula positiva para TL1A con un valor de EC_{50} menor que aproximadamente 10 nM.

Las variantes del anticuerpo 320-179 son, preferiblemente, monoclonales y, más preferiblemente, son anticuerpos de longitud completa que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. En algunos aspectos, los anticuerpos comprenden derivados o fragmentos o porciones de

anticuerpos que retienen la especificidad de unión al antígeno y, preferiblemente, también tienen la mayor parte o toda la afinidad de la molécula del anticuerpo parental 320-179 (por ejemplo, por TL1A). Por ejemplo, los derivados pueden comprender por lo menos una región variable (una región variable ya sea de la cadena pesada o de la cadena liviana). Otros ejemplos de derivados y fragmentos de anticuerpo adecuados incluyen, en un sentido no taxativo, anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos 5 biespecíficos, anticuerpos multiespecíficos, *diabodies*, moléculas de cadena simple, así como moléculas de FAb, F(Ab')₂, Fd, Fabc y Fv, anticuerpos de cadena simple (Sc), anticuerpos Fv de cadena simple (scFv), cadenas livianas de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos 10 individuales, fusiones entre las cadenas de anticuerpos y otras moléculas, monómeros o dímeros de la cadena pesada, monómeros o dímeros de la cadena liviana, dímeros que consisten en una cadena pesada y una liviana, y otros multímeros. Los anticuerpos Fv de cadena simple pueden ser 15 multivalentes. Se pueden usar todos los isotipos de anticuerpo para producir derivados, fragmentos y porciones de anticuerpo. Los derivados, fragmentos y/o porciones de anticuerpo se pueden producir y expresar de manera recombinante en cualquier tipo de célula, procariota o 20

eucariota.

En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada como HCVR o VH en la presente) y una región
5 constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de la cadena liviana (abreviada como LCVR o VL en la presente) y una región constante de la cadena liviana. La
10 región constante de la cadena liviana consiste en un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), interdispersas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de
15 marco de trabajo (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Típicamente, es menos probable que las propiedades de unión al antígeno de un anticuerpo sean
20 afectadas por cambios en las secuencias FR que por cambios en las secuencias CDR. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

Las variantes del anticuerpo 320-179 son completamente humanas. Los anticuerpos completamente humanos son aquellos en donde la molécula completa es humana o de origen humano de otra manera, o incluye una secuencia de aminoácidos idéntica a una forma humana del anticuerpo. Los anticuerpos completamente humanos incluyen aquellos que se obtienen de una biblioteca de genes V humana, por ejemplo, donde los genes humanos que codifican las regiones variables de los anticuerpos se expresan de manera recombinante. Los anticuerpos completamente humanos se pueden expresar en otros organismos (por ejemplo, en ratones y con tecnología *Xenomouse*) o en células de otros organismos transformados con genes que codifican anticuerpos humanos. Sin embargo, los anticuerpos completamente humanos pueden incluir residuos de aminoácidos que no son codificados por las secuencias humanas, por ejemplo, por mutaciones introducidas aleatoriamente o mutaciones dirigidas al sitio.

En algunos aspectos, las variantes del anticuerpo 320-179 pueden comprender esqueletos proteicos que no derivan de inmunoglobulinas. Por ejemplo, refiérase a (Ku & Schutz, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6552-6556) donde se describe un citocromo proteico b562 conformado por un haz de cuatro hélices que tiene dos bucles randomizados para crear CDR, que fueron seleccionadas para la unión al antígeno.

Las variantes del anticuerpo 320-179 pueden comprender modificaciones o unidades de postraducción, que pueden afectar la actividad o la estabilidad del anticuerpo. Estas modificaciones o unidades incluyen, pero en un sentido no
5 taxativo, unidades metiladas, acetiladas, glicosiladas, sulfatadas, fosforiladas, carboxiladas y amidadas y otras unidades que son bien conocidas en el arte. Las unidades incluyen cualquier grupo químico o combinaciones de los grupos que habitualmente se encuentran sobre las moléculas de
10 inmunoglobulina en la naturaleza o que se agregan de otra manera a los anticuerpos por medio de sistemas de expresión recombinante, incluyendo sistemas de expresión procariotas y eucariotas.

Los ejemplos de modificaciones de las cadenas laterales
15 contempladas por la divulgación incluyen modificaciones de grupos amino tal como por alquilación reductora mediante reacción con un aldehído seguido por reducción con NaBH_4 ; amidinación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato;
20 trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencensulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido por reducción con NaBH_4 .

El grupo guanidina de los residuos arginina se pueden modificar por formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butandiona, fenilglioxal y glioxal. El grupo carboxilo se puede modificar mediante activación de carbodiimida por formación de O-acilisourea seguido por una subsiguiente derivación, por ejemplo, en una amida correspondiente. Los grupos sulfidrilo se pueden modificar mediante métodos tales como carboximetilación con ácido iodoacético o iodoacetamida; oxidación de ácido perfórmico en ácido cisteico; formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados mercuriales usando 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercuri-4-nitrofenol y otros mercuriales; carbamoilación con cianato a pH alcalino. Los residuos triptofano se pueden modificar, por ejemplo, por oxidación con N-bromosuccinimida o por alquilación del anillo indol con bromuro de 2-hidroxí-5-nitrobencilo o con haluros de sulfenilo. Por otro lado, los residuos de tirosina se pueden alterar mediante nitración con tetranitrometano para formar un derivado 3-nitrotirosina. La modificación del anillo imidazol de un residuo histidina se puede efectuar mediante alquilación con derivados del ácido iodoacético o N-

carbetoxilación con dietilpirocarbonato.

Las variantes del anticuerpo 320-179 pueden incluir modificaciones que modulan la vida media y la biodistribución en suero incluyendo, en un sentido no taxativo, modificaciones que modulan la interacción del anticuerpo con el receptor Fc neonatal (FcRn), un receptor con un rol clave en la protección de la IgG contra el catabolismo, y mantenimiento una concentración de anticuerpos en suero elevada. Las modificaciones moduladoras de la vida media en suero pueden efectuarse en la región Fc de la IgG1, IgG2 o IgG4, incluyendo la sustitución triple de M252Y/S254T/T256E (las sustituciones "YTE", con la numeración acorde con el sistema de numeración EU (Edelman, G.M. *et al.*, (1969) *Proc. Natl. Acad. USA* 63, 78-85)), que se describe en la Patente de los EE.UU. N°: 7.083.784. Puede haber otras sustituciones en las posiciones 250 y 428, véase por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 7.217.797, así como en las posiciones 307, 380 y 434, véase, por ejemplo, publicación PCT N°: WO 00/042072. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos en el dominio constante que modulan la unión a los receptores Fc y la subsiguiente función mediada por estos receptores, incluyendo la unión a FcRn y la vida media en suero, se describen en las publicaciones de Patentes de los EE.UU. N°: 2009/0142340, 2009/0068175 y 2009/0092599. Se puede omitir o eliminar la

lisina C-terminal de la cadena pesada de los anticuerpos de cualquier clase para reduce la heterogeneidad (ΔK). La sustitución de S228P (numeración EU) en la IgG4 humana puede estabilizar el intercambio del brazo Fab del anticuerpo *in vivo* (Labrin *et al.*, (2009) *Nature Biotechnology* 27: 8; 767-773), y esta sustitución puede estar presente al mismo tiempo que las modificaciones YTE y/o ΔK .

Las variantes del anticuerpo 320-179 comprenden dominios constantes humanos. Los dominios constantes de la cadena pesada preferiblemente son los dominios constantes de la IgG1, IgG2 o IgG4 humana. Los dominios constantes de la cadena liviana son preferiblemente los dominios constantes lambda humanos. Un dominio lambda humano adecuado comprende la SEQ ID N°: 48.

Las regiones constantes de la cadena pesada de la IgG1 humana que se pueden usar con las variantes de los anticuerpos 320-179 se pueden seleccionar entre la IgG1 humana (SEQ ID N°: 42), la IgG1 (ΔK) humana (SEQ ID N°: 43), la IgG1 252Y/254T/256E humana (SEQ ID N°: 44), la IgG1 252Y/254T/256E (ΔK) humana (SEQ ID N°: 64), la IgG1 L234A/L235A/G237A humana (SEQ ID N°: 63), la IgG1 L234A/L235A/G237A (ΔK) humana (SEQ ID N°: 62), la IgG1 L235A/G237A humana (SEQ ID N°: 65) y la IgG1 L235A/G237A (ΔK) humana (SEQ ID N°: 66). Las regiones constantes de la cadena

pesada de la IgG2 humana que se pueden usar con las variantes de los anticuerpos 320-179 se pueden seleccionar entre una IgG2 humana con o sin ΔK (SEQ ID N°: 67 y SEQ ID N°: 70) y una IgG2 A330S/P331S humana con o sin (ΔK) (SEQ ID N°: 71 y 5 SEQ ID N°: 68). Las regiones constantes de la cadena pesada de la IgG4 humana que se pueden usar con las variantes de los anticuerpos 320-179 se pueden seleccionar entre la IgG4 S228P humana (SEQ ID N°: 45), la IgG4 S228P (ΔK) humana (SEQ ID N°: 46), la IgG4 228P/252Y/254T/256E humana (SEQ ID N°: 47) y la 10 IgG4 228P/252Y/254T/256E (ΔK) humana (SEQ ID N°: 69).

Las variantes del anticuerpo 320-179 se pueden marcar, unir o conjugar con cualquier unidad química o de biomoléculas. Los anticuerpos marcados pueden ser de utilidad en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico o de 15 investigación básica. Dichas marcas/conjugados pueden ser detectables, tales como fluoró cromos, sondas electroquimioluminiscentes, puntos cuánticos, radiomarcas, enzimas, proteínas fluorescentes, proteínas luminiscentes y biotina. Las marcas/conjugados pueden ser agentes 20 quimioterapéuticos, toxinas, isótopos y otros agentes usados para el tratamientos condiciones tal como la muerte de células cancerosas. Los agentes quimioterapéuticos pueden comprender cualquiera que sea adecuado para la finalidad con que se está utilizando el anticuerpo.

Los anticuerpos se pueden derivatizar con grupos protectores/bloqueantes conocidos para impedir el clivaje proteolítico o para mejorar la actividad o estabilidad.

En esta divulgación se describen las secuencias de polinucleótidos que codifican los anticuerpos y sus subdominios (por ejemplo, FR y CDR). Los polinucleótidos incluyen, pero en un sentido no taxativo, ARN, ADN, ADNc, híbridos de ARN y ADN, y hebras de ARN, ADN o híbridos de los mismos de hebra simple, doble o triple. Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región variable de la cadena pesada y/o la región variable de la cadena liviana de una variante del anticuerpo 320-179 que se describe o ejemplifica en la presente. Los complementos de las secuencias de polinucleótidos también se encuentran dentro del alcance de la divulgación.

Un polinucleótido puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 51.

Un polinucleótido puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la

cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 49.

Un polinucleótido puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 50.

Un polinucleótido puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 52.

Un polinucleótido puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5 puede

comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°:
53.

Un polinucleótido puede comprender una secuencia de
ácidos nucleicos que codifica una región variable de la
5 cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de
aminoácidos de la SEQ ID N°: 6. Un polinucleótido que
codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6 puede
comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°:
54.

10 Un polinucleótido puede comprender una secuencia de
ácidos nucleicos que codifica una región variable de la
cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de
aminoácidos de la SEQ ID N°: 7. Un polinucleótido que
codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7 puede
15 comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°:
55.

Un polinucleótido puede comprender una secuencia de
ácidos nucleicos que codifica una región variable de la
cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de
20 aminoácidos de la SEQ ID N°: 8. Un polinucleótido que
codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8 puede
comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°:
56.

Un polinucleótido puede comprender una secuencia de

ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10
5 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 57.

En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y una segunda
10 secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo. Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede codificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 y una región
15 variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 51 y un polinucleótido que codifica la secuencia de
20 aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 50.

Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede codificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID N°: 3 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 51 y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 52.

Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede codificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 51 y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 54.

Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede codificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7. Un

polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 51 y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 55.

Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede codificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 51 y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 56.

Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede codificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 puede comprender la secuencia de ácidos

nucleicos de la SEQ ID N°: 51 y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 57.

5 Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede codificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4. Un
10 polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 49 y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°:
15 52.

 Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede codificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que
20 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 49 y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 5 puede

comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°:
53.

Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede
codificar una región variable de la cadena pesada del
5 anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que
comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6. Un
polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N°: 1 puede comprender la secuencia de ácidos
10 nucleicos de la SEQ ID N°: 49 y un polinucleótido que
codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6 puede
comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°:
54.

Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede
15 codificar una región variable de la cadena pesada del
anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la
SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que
comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7. Un
polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la
20 SEQ ID N°: 1 puede comprender la secuencia de ácidos
nucleicos de la SEQ ID N°: 49 y un polinucleótido que
codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7 puede
comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°:
55.

Una primera secuencia de ácidos nucleicos puede codificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8. Un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 49 y un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8 puede comprender la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 56.

En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región constante de la cadena pesada. En aspectos preferidos, el polinucleótido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3 y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región constante de la cadena pesada de la IgG1(Δ K) de la SEQ ID N°: 43, por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 58.

En algunos aspectos, el polinucleótido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región constante de la cadena liviana. En aspectos preferidos, el polinucleótido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región variable de la cadena liviana del anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 4 y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una región constante lambda de la cadena liviana de la SEQ ID N°: 48, por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID N°: 59.

Cualquiera de los polinucleótidos que se describen o ejemplifican en la presente puede estar comprendido en un vector. Por lo tanto, se proveen vectores que comprenden polinucleótidos como parte de la divulgación. Los vectores pueden ser vectores de expresión. Asimismo, se proveen vectores de expresión recombinantes que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de interés. El vector de expresión puede contener una o más secuencias adicionales tal como, pero en un sentido no taxativo, secuencias reguladoras, un marcador de selección, una marca de purificación o una señal de poliadenilación. Los elementos

reguladores pueden incluir un promotor de la transcripción, potenciadores, sitios de unión ribosómicos de ARNm o secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

5 Los vectores de expresión, en especial los vectores de expresión de mamífero, pueden incluir uno o más elementos no transcritos tal como un origen de replicación, un promotor adecuado y un potenciador ligado al gen a expresar, y otras secuencias no transcritas flanqueadoras 5' o 3', y secuencias
10 no traducidas 5' o 3', tales como los sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, un donante de corte y empalme y sitios aceptores, o secuencias de terminación de la transcripción. También se puede incorporar un origen de replicación que confiera la capacidad de
15 replicación en un huésped específico.

Los vectores se pueden usar para transformar cualquiera de una gran variedad de células huésped bien conocidas por los especialistas en el arte y preferiblemente las células huésped tienen la capacidad para expresar anticuerpos. Los
20 vectores incluyen, en un sentido no taxativo, plásmidos, fagémidos, cósmidos, bácmidos, cromosomas bacterianos artificiales (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC) y baculovirus, así como otros vectores bacterianos, eucariotas, de levadura y virales. Las células huésped

adecuadas incluyen, en un sentido no taxativo, células CHO, células NS0, células HEK293 o cualquier línea celular eucariota estable conocida o producida, y también incluyen células bacterianas, de levadura y de insecto.

5 Los anticuerpos también se puede producir en células de hibridoma; siendo los métodos para producir hibridomas bien conocidos y establecidos en el arte.

La divulgación también provee composiciones que comprenden las variantes de los anticuerpos 320-179. Las
10 composiciones pueden comprender cualquiera de los anticuerpos que se describen y/o ejemplifican en la presente y un vehículo aceptable, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados incluyen cualquier medio que no interfiera con la actividad biológica del anticuerpo y
15 preferiblemente no son tóxicos para el huésped a quien se los administran. Las composiciones se pueden formular para su administración a un sujeto en cualquier forma de dosificación adecuada.

Las variantes de los anticuerpos 320-179 se pueden usar
20 para tratar una enfermedad de las vías respiratorias, una enfermedad gastrointestinal, artritis o enfermedades de la piel en un sujeto. Por consiguiente, la divulgación describe métodos de tratamiento. En general, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una

composición con la misma, a un sujeto que necesita
tratamiento para una enfermedad de las vías respiratorias,
una enfermedad gastrointestinal, artritis o enfermedades de
la piel, de modo tal que la enfermedad de las vías
5 respiratorias, la enfermedad gastrointestinal, artritis o las
enfermedades de la piel sea tratada. La variante del
anticuerpo 320-179 puede comprender cualquiera de los
anticuerpos que se describen o ejemplifican en la presente.
La administración puede comprender una administración por vía
10 subcutánea del anticuerpo. La administración puede comprender
una administración por vía intravenosa del anticuerpo.
Preferiblemente el sujeto es un ser humano. El sujeto puede
ser un primate no humano, tal como un mono cinomolgo, o puede
ser un mamífero tal como un ratón, rata, cobayo, gato, cerdo,
15 conejo o perro.

En los aspectos donde se debe tratar una enfermedad de
las vías respiratorias, los métodos comprenden administrar
una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la
misma, a un sujeto que necesita tratamiento para una
20 enfermedad de las vías respiratorias. La enfermedad de las
vías respiratorias puede comprender uno o más entre asma,
enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis
pulmonar, sarcoidosis pulmonar, rinitis alérgica o fibrosis
quística. Así, por ejemplo, en algunos aspectos, los métodos

comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para asma, de modo que el asma sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden

5 administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para EPOC, de modo que la EPOC sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una

10 composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para fibrosis pulmonar, de modo tal que la fibrosis pulmonar sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un

15 sujeto que necesita tratamiento para sarcoidosis pulmonar, de modo tal que la sarcoidosis pulmonar sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita

20 tratamiento para la rinitis alérgica, de modo tal que la rinitis alérgica sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para fibrosis quística, de

modo tal que la fibrosis quística sea tratada en el sujeto.

En los aspectos donde se tratará una enfermedad gastrointestinal, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad gastrointestinal. La enfermedad gastrointestinal puede comprender uno o más entre enfermedad de intestino inflamatorio (IBD), enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, síndrome de intestino irritable (IBS), esofagitis eosinofílica o una enfermedad o condición gastrointestinal asociada con la fibrosis quística. Así, por ejemplo, en algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para IBD, de modo que la IBD sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para la enfermedad de Crohn, de modo que la enfermedad de Crohn sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para colitis, de modo que la colitis sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo

320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para colitis ulcerosa, de modo que la colitis ulcerosa sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para IBS, de modo que el IBS sea tratado en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para esofagitis eosinofílica, de modo que la esofagitis eosinofílica sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad o condición gastrointestinal asociada con fibrosis quística, de modo tal que la enfermedad o condición gastrointestinal asociada con fibrosis quística sea tratada en el sujeto.

En los aspectos donde se tratará artritis, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para artritis. La artritis puede comprender artritis reumatoide. Así, por ejemplo, en algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un

sujeto que necesita tratamiento para artritis reumatoide, de modo tal que la artritis reumatoide sea tratada en el sujeto.

En los aspectos donde se tratará una enfermedad de la piel, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad de la piel. Las enfermedades de la piel pueden comprender uno o más entre dermatitis atópica, eczema o escleroderma. Así, por ejemplo, en algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para dermatitis atópica, de modo tal que la dermatitis atópica sea tratada en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para eczema, de modo que el eczema sea tratado en el sujeto. En algunos aspectos, los métodos comprenden administrar una variante del anticuerpo 320-179, o una composición con la misma, a un sujeto que necesita tratamiento para escleroderma, de modo que el escleroderma sea tratado en el sujeto.

Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento

de una enfermedad de las vías respiratorias. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de artritis. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades de la piel. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de cualquiera entre asma, EPOC, fibrosis pulmonar, sarcoidosis pulmonar, rinitis alérgica, fibrosis quística, enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, síndrome de intestino irritable, esofagitis eosinofílica, una enfermedad o condición gastrointestinal asociada con fibrosis quística, artritis, artritis reumatoide, dermatitis atópica, eczema o escleroderma.

Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias. Las

variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de asma. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de enfermedades de la piel. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de EPOC. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de fibrosis pulmonar. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de sarcoidosis pulmonar. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de rinitis alérgica. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de fibrosis quística. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de la enfermedad de intestino inflamatorio. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden

usar en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de colitis. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de colitis ulcerosa. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de esofagitis eosinofílica. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad o condición gastrointestinal asociada con fibrosis quística. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento del síndrome de intestino irritable. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de artritis reumatoide. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de dermatitis atópica. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de eczema. Las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente se pueden usar en el tratamiento de escleroderma.

También se provee un método *in vitro* para detectar TL1A en una muestra de tejido aislada de un sujeto, que comprende poner el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-19 en contacto con una muestra de tejido
5 aislada de un sujeto para formar un complejo de anticuerpo-TL1A y detectar el complejo en la muestra de tejido.

Se puede usar una variante del anticuerpo 320-179 para detectar células positivas para TL1A, por ejemplo, en una muestra de tejido obtenida de un sujeto. Los anticuerpos se
10 pueden usar para detectar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) positivas para TL1A, por ejemplo, PBMC obtenidas de un sujeto. Los anticuerpos se pueden usar para detectar TL1A en el suero sanguíneo. Dichos métodos se pueden llevar a cabo *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* o *in situ*. En
15 general, los métodos comprenden poner cualquiera de las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente en contacto con un tejido o con células, por ejemplo, PBMC, que se aislaron de un sujeto para formar un complejo de anticuerpo-TL1A y detectar el complejo
20 en dicho tejido o sobre las células. El anticuerpo se puede marcar con una marca detectable. El anticuerpo se puede detectar con un anticuerpo secundario que se marca con una marca detectable. El tejido puede comprender, o puede ser, un fluido biológico tal como sangre o suero sanguíneo. El tejido

puede comprender, o puede ser, tejido de las vías respiratorias, tal como tejido de pulmón, esputo, fluido de lavaje broncoalveolar, tejido gastrointestinal o fluido de un lavaje gastrointestinal. El tejido puede comprender, o puede ser, piel o tejido dérmico. El tejido puede comprender, o puede ser, tejido de cualquier articulación del cuerpo. El método además puede comprender aislar el tejido del sujeto. Dichos métodos pueden ser cuantitativos, por ejemplo, pueden cuantificar el nivel de TL1A en el tejido, pueden cuantificar el nivel de células positivas para TL1A o pueden cuantificar el nivel de TL1A sobre las células o pueden cuantificar el nivel de TL1A en el suero.

La divulgación también describe conjuntos de elementos que comprenden cualquiera de las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen y ejemplifican en la presente. Los conjuntos de elementos se pueden usar para suministrar los anticuerpos y otros agentes para su uso en métodos de diagnóstico, de investigación básica o terapéuticos, entre otros. En algunos aspectos, los conjuntos de elementos comprenden cualquiera entre una o más de las variantes de los anticuerpos 320-179 que se describen o ejemplifican en la presente e instrucciones para emplear dichos uno o más anticuerpos en un método de tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias, en un método de tratamiento de una

enfermedad gastrointestinal o en un método de tratamiento de artritis.

Los siguientes ejemplos se proveen para describir la divulgación con mayor detalle. Se pretende que ilustren la divulgación, pero no en un sentido limitante.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

En estos ejemplos las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. Las CDR se definen de acuerdo con el método AbM del sistema de definición CDR en todo el documento.

1.1. Generación de haces de variantes. Se utilizaron las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y liviana del anticuerpo 320-179 (SEQ ID N°: 1 y 2, respectivamente) como moldes para el diseño de variantes puntuales. El anticuerpo 320-179 ya fue descrito con anterioridad en la publicación de Patente de los EE.UU. N°: 2014/0255302 (en dicha publicación VH es la SEQ ID N°: 186 y VL es la SEQ ID N°: 199) como 320-179 (también descrito como C320-179). Este anticuerpo tenía propiedades biofísicas favorables, era un inhibidor potente de TL1A y tenía un perfil de inmunogenicidad predicha baja.

Las variantes del anticuerpo 320-179 se obtuvieron mediante sustitución de uno de un grupo de nueve aminoácidos

representativos - A, S, Q, D, H, K, L, W, Y - uno por vez en una de cada posición de aminoácido de la CDR (definida por la nomenclatura AbM) en la CDR1 de la cadena liviana (CDR-L1), la CDR3 de la cadena liviana (CDR-L3), la CDR1 de la cadena pesada (CDR-H1) y la CDR2 de la cadena pesada (CDR-H2). Las variantes del anticuerpo, que incorporan A, S, Q, D, H, K, L, W, Y, también se efectuaron para las posiciones 59 y 60 en la cadena pesada variable y en la posición 79 en la cadena liviana variable. En las Figuras 1 (cadena pesada variable) y 2 (cadena liviana variable), se muestra una lista completa de todas las variantes de anticuerpo de una sola sustitución generadas.

1.2. Construcción de vectores que expresan anticuerpos. Las variantes de la región variable se generaron mediante retrotraducción de las secuencias de aminoácidos en secuencias de ADN que luego fueron sintetizadas *de novo* por ensamblaje de oligonucleótidos sintéticos. Las variantes V_H fueron subclonadas en un vector de expresión de mamífero que contiene una región constante humana para producir las cadenas pesadas de anticuerpo de longitud completa (C_H1 , bisagra, dominios C_H2 y C_H3 de la cadena pesada de la IgG1 humana) (por ejemplo, UniProt N° P01857). De manera similar, se subclonaron variantes V_L en un vector de expresión de mamífero que contiene una región constante lambda de la

cadena liviana humana para producir cadenas lambda del anticuerpo de longitud completa (SwissProt N° P0CG05.1). En algunos casos, la cadena pesada de longitud completa y, por separado, la cadena liviana, se retrotradujeron en secuencias de ADN y subsiguientemente se sintetizaron *de novo* mediante ensamblaje de oligonucleótidos sintéticos.

1.3. Expresión de las variantes de anticuerpos. Los anticuerpos se produjeron por cotransfección de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo en células EXPI293® (Life Technologies, Carlsbad, CA). El día antes de la transfección, se determinó la cantidad de células necesarias para el experimento. Para cada 20 ml de transfección, se necesitaron $3,6 \times 10^7$ células en 20 ml de medio de expresión EXPI293®. El día antes de la transfección, las células se sembraron a una densidad de $0,9 \times 10^6$ células viables/ml y se incubaron durante la noche a 37 °C en atmósfera humidificada de 8% de CO₂ en aire sobre un agitador orbital que rota a 200 rpm. El día de la transfección, se determinó el número y la viabilidad de las células usando un contador de células automático. Solamente se utilizaron cultivos con >98% de células viables. Para cada 20 ml transfección, se prepararon complejos de lípido-ADN por dilución de 10 µg de ADN de la cadena pesada y 10 µg de ADN de la cadena liviana en medio de suero reducido I OPTI-MEM® (Life Technologies, Carlsbad, CA)

(N° cat. 31985-062) hasta un volumen total de 1,0 ml. Se diluyeron 54 µl de reactivo EXPIFECTAMINE® 293 (Life Technologies, Carlsbad, CA) en medio I OPTI-MEM® hasta un volumen total de 1,0 ml. Ambos viales se agitaron suavemente y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, se mezcló el ADN diluido con el reactivo EXPIFECTAMINE® 293 diluido con la mezcla de ADN-reactivo EXPIFECTAMINE® 293 y se incubó por otros 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos de ADN-reactivo EXPIFECTAMINE® 293. Después de la incubación, se agregaron 2 ml del complejo de ADN-reactivo EXPIFECTAMINE® 293 a cada tubo biorreactor de 50 ml (TPP Techno Plastic Products AG). Al tubo de control negativo, se agregaron 2 ml de medio I OPTI-MEM® (Life Technologies, Carlsbad, CA) en lugar del complejo de ADN-reactivo EXPIFECTAMINE® 293. Las células se incubaron en un incubador a 37 °C con una atmósfera humidificada de 8% de CO₂ en aire sobre un agitador orbital que rota a 200 rpm. Después de aproximadamente 16-18 horas de postransfección, se agregaron 100 µl del potenciador de transfección 1 EXPIFECTAMINE® 293 y 1,0 ml del potenciador de transfección 2 EXPIFECTAMINE® 293 a cada biorreactor. Los anticuerpos se cosecharon aproximadamente 72 horas después de la transfección.

1.4. Purificación de las variantes de anticuerpos. Cada

variante de anticuerpo se expresó en células EXPI293® en 20 ml de cultivo celular. Los cultivos se centrifugaron en tubos Falcon de 50 ml a 3000 x g por 20 minutos y los sobrenadantes se filtraron usando un filtro de 0,22 µm (Corning). Los sobrenadantes se purificaron usando un robot Gilson ASPEC GX274. Brevemente, se preequilibraron cartuchos SPE (Agilent, 12131014) empaquetados con 1,2 ml de resina de proteína A MABSELECT SURE® (GE Healthcare Bio-Sciences AB Uppsala, Suecia) con 3 volúmenes de columna de PBS 1X. Se pasaron 18 ml de sobrenadante por las columnas seguido por un lavado de 4 ml de PBS 1X. Cada columna se preeluyó con 0,9 ml de ácido cítrico 0,1 M, pH 2,9. Los anticuerpos purificados se eluyeron con 2 ml de ácido cítrico 0,1 M, pH 2,9. A continuación, los anticuerpos se desalaron en PBS de Sørensen (KH₂PO₄ 59,5 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 7,3 mM, NaCl 145,4 mM (pH ~5,8)) usando columnas PD-10 (GE Healthcare).

1.5. Expresión y unión al antígeno de los anticuerpos determinadas por SPR. Se empleó un chip sensor CM5 (GE Healthcare) para acoplar la Proteína A (Pierce) a la superficie del chip usando un conjunto de elementos para acoplamiento de aminos (GE Healthcare). La Proteína A se acopló sobre las celdas de flujo 1 y 2 (o, como alternativa, 3 y 4) usando un BIACORE® T200. Los sobrenadantes de las células EXPI-293® que contienen anticuerpos o, como

alternativa, anticuerpos purificados (como se describió en 1.4) se hicieron pasar sobre la superficie de la celda de flujo 2, en tanto se pasó solución amortiguadora (HBS-EP) sobre la celda de flujo 1. La cantidad de sobrenadante o de proteína purificada (así como la concentración) inyectada durante la etapa de captura variaba entre las corridas y se especifica en el encabezado de las Tablas 3-11. Al finalizar la inyección del sobrenadante o del anticuerpo purificado se midieron las unidades de cambio de respuesta. Este valor se informó como el Nivel de captura en las Tablas 3-11. Para determinar si el anticuerpo se unía a TL1A, después se hizo pasar TL1A sobre las celdas de flujo 1 y 2 y se midieron las unidades de respuesta antes de finalizar la inyección de TL1A (la fase de asociación). Este valor se indica como el Nivel de unión a TL1A (temprano) en las Tablas 3-11. Las unidades de respuesta se midieron antes de finalizar la fase de disociación. Este valor se indica como Nivel de unión a TL1A (tardío) en las Tablas 3-11 y es una medida de la cantidad de anticuerpo que se perdió de la superficie del chip como resultado de la disociación del complejo de TL1A-anticuerpo. Se emplearon dos referencias para los sensorgramas (la celda de flujo 2 se resta de la celda de flujo 1 y un blanco de solución amortiguadora). Dado que había un gran número de variantes de anticuerpo para examinar y seleccionar, se

seleccionaron en corridas diferentes (Tablas 3-11). En cada caso (excepto la Corrida 3) se incluyó el anticuerpo parental, 320-179, en la corrida, a efectos comparativos. A continuación, se ofrece un resumen de las condiciones
5 utilizadas en cada corrida:

10

15

20

Tabla 1:

5

10

15

20

N° corrida	Sobrenadante	Proteínas	Nivel de captura aproximado (RU)	Conc. muestra de TL1A (ug/ml)	Punto de tiempo del nivel de unión TL1A (temprano)	Punto de tiempo del nivel de unión a TL1A (tardío)	Notas
1		x	400	10	59	590	Anticuerpo diluido a 2 ug/ml, tiempo de captura variable
2	x		1000	10	44	220	Sobrenadante diluido en solución amortiguadora de corrida, tiempos de captura variables
2		x	400	10	44	590	Anticuerpo diluido 2 ug/ml, tiempo de captura variable

5	3	x		variable	10	59	590	Sobrenadante diluido en solución amortiguadora de corrida, captura de 60 s
	4		x	500	5	44	220	Anticuerpo diluido a 2 ug/ml en solución amortiguadora de corrida
	5	x		100	5	44	220	Sobrenadante diluido en solución amortiguadora de corrida,
10	6		x	variable	5	44	170	Anticuerpo diluido a 2 ug/ml en solución amortiguadora de corrida y captura por 45 s
	7 *		x	400	5	44	220	Anticuerpo diluido a 2 ug/ml aproximadamente
	8		x	400	5	44	590	Anticuerpo diluido a 2 ug/ml, tiempo de captura variable
15	9		x	400	5	44	590	Anticuerpo diluido a 2 ug/ml, tiempo de captura variable

* Esta corrida se realizó con un equipo Biacore® A100

También se determinó la unión del anticuerpo anti-TL1A al TL1A de diferentes especies usando SPR. El anticuerpo anti-TL1A se capturó sobre la superficie de una Proteína A. Se hizo pasar TL1A, ya sea humano, de rata, ratón, conejo, cobayo, cerdo, perro, gato o mono cinomolgo, sobre la superficie y se midieron las unidades de respuesta.

1.6. Producción de TL1A. El TL1A humano se produjo en el

sistema de expresión de mamífero EXPI293®, usando una construcción de expresión de ADN que codifica el dominio extracelular (ECD) del TL1A humano con una marca FLAG y una marca HIS ubicada en posición N-terminal. Se generaron otras

5 formas de TL1A de distintas especies basado en listados de secuencias disponibles en bases de datos públicas. Se resumen a continuación:

Tabla 2:

10	Especies con TL1A	Referencia a bases de datos públicas	SEQ ID N°:
	Humano	UniProt: O95150	31
15	Mono cinomolgo	SEQ ID N°: 125 de la publicación de Patente de los EE.UU. N°: 2014/0255302	34
	Ratón	UniProt: Q5UBV8	35
	Rata	UniProt: Q8K3Y7	36
	Cobayo	UniProt: H0VFN8	37
	Gato	NCBI: XP_003995828.1	38
20	Cerdo	UniProt: I3LL00	39
	Conejo	UniProt: G1T1T1	40
	Perro	UniProt: J9P221	41

El sobrenadante del cultivo que contiene la proteína

TL1A secretada se cosechó mediante centrifugación a 2000 x g durante 10 min para eliminar las células. La proteína TL1A se purificó a partir del sobrenadante usando una columna HISTRAP® HP (GE Healthcare). La proteína eluída se
5 intercambió por solución amortiguadora en PBS usando una columna de grado preparativo HILOAD® 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) y se separó una fracción de ~70 kDa mediante filtración en gel sobre una columna de grado preparativo HILOAD® 26/60 SUPERDEX® 200 (GE Healthcare).

10 1.7. Ensayo de potencia con la línea celular TF-1. Para determinar los anticuerpos anti-TL1A que neutralizan funcionalmente la actividad biológica de TL1A, los anticuerpos fueron evaluados por su capacidad para neutralizar la apoptosis inducida por TL1A en una línea
15 celular TF-1. La línea celular eritroleucémica TF-1 humana (ATCC: CRL-2003) se mantuvo en cultivo bajo condiciones estándar. Se incubaron células TF-1 ($7,5 \times 10^4$ /pocillo) en placas de lados negros de 96 pocillos (Greiner) con el TL1A humano 100 ng/ml y cicloheximida 10 µg/ml para inducir
20 apoptosis. Los anticuerpos de prueba se agregaron a una concentración de 10 µg/ml (66,7 nM) o menos a las placas y se incubaron durante 4 a 5 horas. Luego se evaluó la inducción de apoptosis usando el conjunto de elementos de caspasas homogéneas (Roche) de acuerdo con las instrucciones del

proveedor.

Los datos se normalizaron por expresión como un porcentaje de la apoptosis máxima (los niveles de apoptosis alcanzados con el TL1A humano más cicloheximida en la
5 ausencia del anticuerpo anti-TL1A).

1.8. Selectividad para el receptor de los anticuerpos principales. El TL1A se une tanto a su receptor señalización conocido, DR3, como a un receptor señuelo, DcR3, que también sirve como un receptor señuelo para los miembros de familia
10 TNF, Fas-L y LIGHT. Los anticuerpos fueron evaluados por su capacidad para inhibir la unión de TL1A a sus receptores en un ELISA de competencia. Se recubrió una placa de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) con la quimera DR3/Fc (R&D Systems) o la quimera DcR3/Fc (R&D Systems) a una concentración de 2 µg/ml.
15 Los anticuerpos de prueba diluidos en serie se preincubaron con el TL1A humano de un solo sitio biotinilado 1 µg/ml durante 30 minutos y luego se agregaron a los pocillos recubiertos con DR3/Fc o DcR3/Fc. El TL1A unido se detectó usando estreptavidina-peroxidasa de rábano picante 1:2000 (BD
20 Pharmingen). Los datos se normalizaron por expresión como un porcentaje de la unión máxima de TL1A al receptor en la ausencia del anticuerpo anti-TL1A.

1.9. Ensayo de exclusión cinética. En este ensayo se mide la concentración libre de uno de los miembros de unión

sin afectar el equilibrio. Las soluciones se pueden preparar fuera de línea, usando proteínas en solución no modificadas, y las mediciones de afinidad se pueden leer días después del mezclado para asegurar que hayan llegado al equilibrio. En un
5 ensayo de exclusión cinética, se mantiene un miembro de interacción (denominado miembro de unión constante o CBP) a una concentración constante, en tanto el otro (denominado titulante) se diluye en serie. Los ensayos de exclusión cinética se pueden usar para determinar la constante de
10 disociación (K_D) y la afinidad de una interacción de anticuerpo-antígeno. En un ensayo de exclusión cinética típico, el titulante se inmoviliza sobre esferas (por ejemplo, esferas de PMMA o Sepharose) y se usa para capturar el CBP libre en la solución. Luego se usa una sonda
15 secundaria marcada para cuantificar la cantidad de CBP capturado. Hay una revisión del ensayo de exclusión cinética en Darling, RK *et al.*, (2004) *ASSAY and Drug Development Technol.*, 2(6): 647-57.

Los componentes se combinaron y se dejó que alcanzaran
20 el equilibrio. Luego se empleó el ensayo de exclusión cinética para medir la fracción libre de CBP. Se analizaron las curvas de equilibrio con numerosas concentraciones de CBP usando la herramienta de análisis de n-curvas del software KinExA® Pro (Versión 4.1.11, Sapidyne) para obtener

determinaciones K_D robustas. La interacción de 320-587 por el TL1A humano se examinó usando dos orientaciones: (1) el CBP es el 320-587, el titulante es el TL1A y (2) el CBP es el TL1A, el titulante es 320-587.

5 **Ejemplo 2**

Resultados experimentales

2.1. Selección de variantes de unión TL1A con una disociación equivalente o mejorada con relación a C320-179. Se construyeron y se expresaron variantes del anticuerpo 320-179 como se describió previamente. Se evaluaron los sobrenadantes de EXPI293® (Life Technologies Corp.) de cada variante mediante BIACORE® (GE Healthcare) y los datos obtenidos se compararon con los del anticuerpo parental 320-179. En algunos experimentos los anticuerpos se purificaron usando cromatografía con la Proteína A (Véase 1.4) y los anticuerpos purificados se utilizaron en experimentos con BIACORE® (GE Healthcare). En las Tablas 3-11 se muestra el nivel de expresión de cada variante, junto con su unión a TL1A en un punto de tiempo temprano y tardío. En corridas posteriores (Tablas 10 y 11) se evaluaron las variantes de anticuerpo que contienen más de una sustitución de aminoácido.

Tabla 3: Experimento SPR - Corrida 1 - Anticuerpos anti-

TL1A que se unen a TL1A. El * indica los anticuerpos que fueron seleccionados para las pruebas del ensayo de potencia.

5	320- 185*	Ninguna	L79S	401	137	114
	320- 186*	Ninguna	L79Q	398	136	113
	320- 187*	Ninguna	L79D	388	134	112
10	320- 188*	Ninguna	L79H	397	136	113
	320- 189*	Ninguna	L79K	393	130	107
	320- 190*	Ninguna	L79W	395	136	113
15	320- 191*	Ninguna	L79Y	408	140	117

Tabla 4: Experimento SPR - Corrida 2 - Anticuerpos anti-TL1A que se unen a TL1A. El * indica los anticuerpos que fueron seleccionados para las pruebas del ensayo de potencia.

5	Anti-cuerpo	Sustitución VH con relación a 320-179	Sustitución VL con relación a 320-179	Nivel de captura	Nivel de unión a TL1A (Temprano)	Nivel de unión a TL1A (Tardío)	Nivel de captura	Nivel de unión a TL1A (Temprano)	Nivel de unión a TL1A (Tardío)
				Sobrenadante			Anticuerpo purificado		
10	320-179	Ninguna	Ninguna	1133	287	261	410	140	117
	320-192	Ninguna	T24A	960	238	218	-	-	-
	320-193	Ninguna	T24S	990	249	227	409	103	91
	320-194	Ninguna	T24Q	974	247	226	398	76	64
15	320-195	Ninguna	T24D	992	249	227	-	-	-
	320-196	Ninguna	T24H	995	250	228	-	-	-
	320-197	Ninguna	T24K	1017	255	232	401	105	94
20	320-198*	Ninguna	T24L	1023	262	241	-	-	-
	320-199	Ninguna	T24W	1050	251	233	404	97	85

5	320-200	Ninguna	T24Y	1027	251	231			
	320-201*	Ninguna	S25A	990	274	252	393	73	57
	320-202*	Ninguna	S25Q	1034	234	214	-	-	-
	320-203	Ninguna	S25D	977	61	24	407	65	35
	320-204	Ninguna	S25H	1003	193	155	-	-	-
10	320-205*	Ninguna	S25K	1025	290	271	401	70	51
	320-206	Ninguna	S25L	1000	257	235	-	-	-
	320-207*	Ninguna	S25W	1022	268	243	-	-	-
	320-208	Ninguna	S25Y	1034	222	199	-	-	-
	320-209*	Ninguna	S26A	1007	222	200	-	-	-
15	320-210	Ninguna	S26Q	1033	225	202	-	-	-
	320-211*	Ninguna	S26D	1025	206	164	392	80	64
	320-212	Ninguna	S26H	1013	226	205	-	-	-
	320-213*	Ninguna	S26K	1052	218	194	422	79	65
	320-214	Ninguna	S26L	1038	221	196	-	-	-
20	320-215	Ninguna	S26W	1021	220	199	-	-	-
	320-216	Ninguna	S26Y	1010	171	147	-	-	-
	320-217	Ninguna	S27A	1076	258	235	-	-	-
	320-218	Ninguna	S27Q	1081	239	218	412	92	80
	320-219*	Ninguna	S27D	1061	243	220	-	-	-
20	320-220	Ninguna	S27H	1049	253	230	-	-	-
	320-221	Ninguna	S27K	1063	225	207	413	99	89
	320-222	Ninguna	S27L	1037	156	96	-	-	-
	320-223	Ninguna	S27W	1061	143	66	-	-	-
	320-224	Ninguna	S27Y	1055	198	153	-	-	-
	320-225	Ninguna	S27a A	1066	267	243	-	-	-
	320-226*	Ninguna	S27a Q	1035	250	228	-	-	-

5	320-227	Ninguna	S27aD	1022	242	218	-	-	-
	320-228	Ninguna	S27aH	1072	259	235	-	-	-
	320-229*	Ninguna	S27aK	1057	268	251	-	-	-
	320-230	Ninguna	S27aL	1087	245	223	-	-	-
	320-231	Ninguna	S27aW	1078	271	243	-	-	-
10	320-232	Ninguna	S27aY	1051	261	235	-	-	-
	320-233	Ninguna	D27bA	1118	255	235	409	48	16
	320-234	Ninguna	D27bS	1089	262	239	-	-	-
	320-235	Ninguna	D27bQ	1110	256	236	-	-	-
	320-236	Ninguna	D27bH	1085	254	232	415	5	6
15	320-237	Ninguna	D27bK	1073	240	221	398	10	8
	320-238	Ninguna	D27bL	1106	221	191	-	-	-
	320-239	Ninguna	D27bW	1079	212	163	-	-	-
	320-240	Ninguna	D27bY	1089	230	196	-	-	-
	320-241*	Ninguna	I27cA	1092	179	122	-	-	-
20	320-242	Ninguna	I27cS	1076	124	49	-	-	-
	320-243	Ninguna	I27cQ	1065	71	26	-	-	-
	320-244*	Ninguna	I27cD	1083	21	20	-	-	-
	320-245*	Ninguna	I27cH	1084	59	26	-	-	-
	320-246	Ninguna	I27cK	1089	32	23	-	-	-
	320-247	Ninguna	I27cL	1078	205	162	-	-	-
	320-248	Ninguna	I27cW	1110	96	30	-	-	-
	320-249	Ninguna	I27cY	1096	77	28	-	-	-
	320-250	Ninguna	G28A	1104	180	115	-	-	-
	320-251	Ninguna	G28S	1085	134	50	-	-	-

Tabla 5: Experimento SPR - Corrida 3 - Anticuerpos anti-

TL1A que se unen a TL1A. El * indica los anticuerpos que fueron seleccionados para las pruebas del ensayo de potencia.

5

10

15

20

5

10

15

20

Anti-cuerpo	Sustitución VH con relación a 320-179	Sustitución VL con relación a 320-179	Nivel de captura	Nivel de unión a TL1A (Temprano)	Nivel de unión a TL1A (Tardío)
			Sobrenadante		
320-252	Ninguna	G28Q	996	20	9
320-253	Ninguna	G28D	1073	6	6
320-254	Ninguna	G28H	1021	17	8
320-255	Ninguna	G28K	842	24	8
320-256	Ninguna	G28L	1055	30	10
320-257	Ninguna	G28W	981	83	18
320-258	Ninguna	G28Y	823	9	6
320-259	Ninguna	A29S	824	194	179
320-260	Ninguna	A29Q	836	182	165
320-261	Ninguna	A29D	956	86	29
320-262	Ninguna	A29H	891	209	190
320-263*	Ninguna	A29K	848	121	123
320-264	Ninguna	A29L	831	199	184
320-265	Ninguna	A29W	1057	168	69
320-266	Ninguna	A29Y	934	218	192
320-267*	Ninguna	G30A	1148	299	297
320-268	Ninguna	G30S	392	28	7
320-269	Ninguna	G30Q	764	126	93
320-270	Ninguna	G30D	511	9	5
320-271	Ninguna	G30H	1067	106	30
320-272	Ninguna	G30K	935	5	5
320-273	Ninguna	G30L	710	4	4
320-274	Ninguna	G30W	796	12	7
320-275	Ninguna	G30Y	751	44	10
320-276	Ninguna	L31A	1273	244	215

5	320-277*	Ninguna	L31S	1741	387	361
	320-278*	Ninguna	L31Q	1696	389	374
	320-279	Ninguna	L31D	561	144	128
	320-280*	Ninguna	L31H	881	228	211
	320-281	Ninguna	L31K	321	22	6
10	320-282	Ninguna	L31W	811	75	16
	320-283	Ninguna	L31Y	317	2	3
	320-284	Ninguna	G32A	374	1	2
	320-285	Ninguna	G32S	400	1	2
	320-286	Ninguna	G32Q	576	1	4
15	320-287	Ninguna	G32D	339	0	2
	320-288	Ninguna	G32H	422	1	3
	320-289	Ninguna	G32K	463	1	3
	320-290	Ninguna	G32L	361	1	2
	320-291	Ninguna	G32W	414	2	3
20	320-292	Ninguna	G32Y	423	111	94
	320-293	Ninguna	V33A	421	104	86
	320-294	Ninguna	V33S	419	79	61
	320-295	Ninguna	V33Q	414	109	94
	320-296	Ninguna	V33D	428	118	104
	320-297*	Ninguna	V33H	420	95	77
	320-298	Ninguna	V33K	416	114	100
	320-299	Ninguna	V33L	420	51	13
	320-300	Ninguna	H34W	417	111	95
	320-301	Ninguna	H34Y	456	108	96
	320-302*	Ninguna	H34A	423	99	74
	320-303	Ninguna	H34S	408	71	32
	320-304	Ninguna	H34Q	401	103	82
	320-305	Ninguna	H34D	424	34	10
	320-306	Ninguna	H34K	452	147	133

5

320-307*	Ninguna	H34L	873	216	200
320-308	Ninguna	H34W	458	106	73
320-309	Ninguna	H34Y	255	47	40
320-310	Ninguna	Q89A	348	70	62
320-311	Ninguna	Q89S	0	0	0

Tabla 6: Experimento SPR - Corrida 4 - Anticuerpos anti-TL1A que se unen a TL1A. El * indica los anticuerpos que fueron seleccionados para las pruebas del ensayo de potencia.

10

15

20

Anti-cuerpo	Sustitución VH con relación a 320-179	Sustitución VL con relación a 320-179	Nivel de captura	Nivel de unión a TL1A (Temprano)	Nivel de unión a TL1A (Tardío)
			Anticuerpo purificado		
320-179	Ninguna	Ninguna	616	177	163
320-312	Ninguna	Q89D	529	10	10
320-313*	Ninguna	Q89H	502	141	132
320-314*	Ninguna	Q89K	598	165	158
320-315	Ninguna	Q89L	515	85	82
320-316	Ninguna	Q89W	535	65	62
320-317	Ninguna	Q89Y	570	86	83
320-318*	Ninguna	S90A	578	160	149
320-319	Ninguna	S90Q	523	18	14
320-320	Ninguna	S90D	534	31	17
320-321	Ninguna	S90H	491	16	13
320-322	Ninguna	S90K	450	17	14
320-323	Ninguna	S90W	490	14	13
320-324	Ninguna	S90Y	528	13	12

5	320-325	Ninguna	Y91A	491	95	83
	320-326*	Ninguna	Y91S	550	126	120
	320-327	Ninguna	Y91Q	493	130	119
	320-328*	Ninguna	Y91H	542	155	146
	320-329	Ninguna	Y91K	600	9	11
10	320-330	Ninguna	Y91L	600	139	119
	320-331*	Ninguna	Y91W	615	173	176
	320-332	Ninguna	D92A	531	66	44
	320-333	Ninguna	D92S	559	95	67
	320-334	Ninguna	D92Q	543	15	14
15	320-335	Ninguna	D92H	581	15	14
	320-336	Ninguna	D92K	484	11	11
	320-337	Ninguna	D92L	475	21	15
	320-338	Ninguna	D92W	548	9	11
	320-339	Ninguna	D92Y	509	10	11
20	320-340	Ninguna	G93A	548	145	132
	320-341	Ninguna	G93S	560	149	135
	320-342	Ninguna	G93Q	560	152	139
	320-343	Ninguna	G93D	545	121	90
	320-344	Ninguna	G93H	529	117	87
	320-345*	Ninguna	G93K	637	163	154
	320-346	Ninguna	G93L	526	126	107
	320-347	Ninguna	G93W	560	149	130
	320-348	Ninguna	G93Y	541	144	127
	320-349	Ninguna	T94A	556	112	88
	320-350	Ninguna	T94S	502	130	118
	320-351	Ninguna	T94Q	553	112	83
	320-352	Ninguna	T94D	568	101	63
	320-353	Ninguna	T94H	558	97	73
	320-354	Ninguna	T94K	536	53	30

5	320-355	Ninguna	T94L	526	102	76
	320-356	Ninguna	T94W	486	109	86
	320-357	Ninguna	T94Y	563	119	91
	320-358	Ninguna	L95A	501	82	50
	320-359	Ninguna	L95S	503	57	27
10	320-360	Ninguna	L95Q	554	86	53
	320-361*	Ninguna	L95D	477	12	11
	320-362	Ninguna	L95H	522	8	9
	320-363	Ninguna	L95Y	566	17	16
	320-364	Ninguna	S95aA	516	124	109
15	320-365	Ninguna	S95aQ	536	141	128
	320-366	Ninguna	S95aD	487	62	31
	320-367	Ninguna	S95aH	595	119	116
	320-368	Ninguna	S95aK	602	50	26
	320-369	Ninguna	S95aL	503	89	60
20	320-370	Ninguna	S95aW	570	66	39
	320-371	Ninguna	S95aY	576	92	70

Tabla 7: Experimento SPR - Corrida 5 - Anticuerpos anti-TL1A que se unen a TL1A.

5	Anti-cuerpo	Sustitución VH con relación a 320-179	Sustitución VL con relación a 320-179	Nivel de captura	Nivel de unión a TL1A (Temprano)	Nivel de unión a TL1A (Tardío)
				Sobrenadante		
10	320-179	Ninguna	Ninguna	83	11	10
	320-372	Ninguna	A96S	106	1	0
	320-373	Ninguna	A96Q	99	-1	-1
	320-374	Ninguna	A96D	98	1	0
	320-375	Ninguna	A96H	108	-2	-1
15	320-376	Ninguna	A96K	98	3	1
	320-377	Ninguna	A96L	101	-1	-1
	320-378	Ninguna	A96W	105	-1	-1
	320-379	Ninguna	A96Y	105	3	1
	320-380	Ninguna	L97A	104	1	1
20	320-381	Ninguna	L97S	97	3	1
	320-382	Ninguna	L97Q	106	0	0
	320-383	Ninguna	L97D	102	3	1
	320-384	Ninguna	L97H	98	3	2
	320-385	Ninguna	L97K	108	1	1
	320-386	Ninguna	L97W	104	1	0
	320-387	Ninguna	L97Y	97	11	10
	320-388	G26A	Ninguna	110	14	13
	320-389	G26S	Ninguna	105	12	11
	320-390	G26Q	Ninguna	100	12	11
	320-391	G26D	Ninguna	106	14	13

5	320-392	G26H	Ninguna	109	12	11
	320-393	G26K	Ninguna	100	12	11
	320-394	G26L	Ninguna	106	13	12
	320-395	G26W	Ninguna	104	13	12
	320-396	G26Y	Ninguna	104	12	11
10	320-397	Y27A	Ninguna	109	12	12
	320-398	Y27S	Ninguna	110	12	11
	320-399	Y27Q	Ninguna	105	10	10
	320-400	Y27D	Ninguna	106	11	11
	320-401	Y27H	Ninguna	100	11	10
15	320-402	Y27L	Ninguna	98	11	10
	320-403	Y27W	Ninguna	84	11	10
	320-404	T28A	Ninguna	84	11	10
	320-405	T28S	Ninguna	79	10	9
	320-406	T28Q	Ninguna	82	8	7
20	320-407	T28D	Ninguna	88	12	11
	320-408	T28H	Ninguna	81	13	12
	320-409	T28K	Ninguna	83	10	10
	320-410	T28L	Ninguna	86	11	10
	320-411	T28W	Ninguna	82	10	9
20	320-412	T28Y	Ninguna	89	10	9
	320-413	F29A	Ninguna	89	9	8
	320-414	F29S	Ninguna	78	7	7
	320-415	F29Q	Ninguna	85	5	4
	320-416	F29D	Ninguna	81	9	8
	320-417	F29H	Ninguna	85	9	8
	320-418	F29K	Ninguna	85	10	9
	320-419	F29L	Ninguna	83	11	9
	320-420	F29W	Ninguna	85	11	10
	320-421	F28Y	Ninguna	81	9	8

5	320-422	T30A	Ninguna	80	10	9
	320-423	T30S	Ninguna	86	10	10
	320-424	T30Q	Ninguna	86	11	10
	320-425	T30D	Ninguna	89	14	12
	320-426	T30H	Ninguna	84	10	9
10	320-427	T30K	Ninguna	88	11	10
	320-428	T30L	Ninguna	88	11	10
	320-429	T30W	Ninguna	90	12	11
	320-430	T30Y	Ninguna	85	6	6
	320-431	S31A	Ninguna	85	6	6

Tabla 8: Experimento SPR - Corrida 6 - Anticuerpos anti-TL1A que se unen a TL1A. El * indica los anticuerpos que fueron seleccionados para las pruebas del ensayo de potencia.

15

20

5

10

15

20

Anti-cuerpo	Sustitución VH con relación a 320-179	Sustitución VL con relación a 320-179	Nivel de captura	Nivel de unión a TL1A (Temprano)	Nivel de unión a TL1A (Tardío)
			Anticuerpo purificado		
320-179	Ninguna	Ninguna	449	111	102
320-432	S31Q	Ninguna	466	116	106
320-433	S31D	Ninguna	412	90	83
320-434	S31K	Ninguna	473	125	113
320-435	S31L	Ninguna	384	92	83
320-436	S31W	Ninguna	525	129	118
320-437	S31Y	Ninguna	501	119	109
320-438	Y32A	Ninguna	468	126	116
320-439	Y32S	Ninguna	464	119	108
320-440	Y32Q	Ninguna	408	108	97
320-441	Y32D	Ninguna	388	80	67
320-442	Y32H	Ninguna	490	124	113
320-443*	Y32K	Ninguna	438	114	103
320-444	Y32L	Ninguna	458	107	95
320-445*	Y32W	Ninguna	442	116	106
320-446	D33A	Ninguna	469	18	8
320-447	D33S	Ninguna	503	37	13
320-448	D33Q	Ninguna	482	7	6
320-449	D33H	Ninguna	483	76	59
320-450	D33K	Ninguna	536	1	3
320-451	D33L	Ninguna	497	19	8
320-452	D33W	Ninguna	445	84	78
320-453	D33Y	Ninguna	449	111	104

5	320-454	I34A	Ninguna	189	43	37
	320-455	I34S	Ninguna	144	27	23
	320-456	I34Q	Ninguna	214	52	46
	320-457	I34D	Ninguna	55	6	4
	320-458	I34H	Ninguna	239	59	53
10	320-459	I34K	Ninguna	93	20	17
	320-460	I34L	Ninguna	441	114	105
	320-461	I34W	Ninguna	465	87	82
	320-462	I34Y	Ninguna	373	58	52
	320-463*	N35A	Ninguna	462	102	101
15	320-464*	N35S	Ninguna	600	130	124
	320-465	N35Q	Ninguna	476	92	78
	320-466	N35D	Ninguna	360	93	86
	320-467	N35H	Ninguna	350	44	24
	320-468	N35K	Ninguna	200	2	2
20	320-469	N35L	Ninguna	315	69	61
	320-470	N35W	Ninguna	329	2	3
	320-471	N35Y	Ninguna	312	3	4
	320-472	Ninguna	S90L	467	23	10
	320-473	Ninguna	Y91D	453	69	55
	320-474	Ninguna	L95K	596	2	4
	320-475	Ninguna	L95W	727	8	8
	320-476	Y27K	Ninguna	560	128	118
	320-477*	S31H	Ninguna	576	148	136
	320-478	A60L	Ninguna	379	85	77
	320-479	A60W	Ninguna	277	61	54
	320-480	A60Y	Ninguna	319	79	73
	320-483	W50A	Ninguna	492	4	6

5

320-484	W50S	Ninguna	555	3	6
320-485	W50Q	Ninguna	460	3	5
320-486	W50D	Ninguna	178	1	2
320-487	W50H	Ninguna	237	2	3
320-488	W50K	Ninguna	293	1	2
320-489	W50L	Ninguna	337	4	5
320-490	W50Y	Ninguna	393	14	8
320-491	L51S	Ninguna	356	85	76

Tabla 9: Experimento SPR - Corrida 7 - Anticuerpos anti-TL1A que se unen a TL1A. El * indica los anticuerpos que fueron seleccionados para las pruebas del ensayo de potencia.

15

20

Anti-cuerpo	Sustitución VH con relación a 320-179	Sustitución VL con relación a 320-179	Nivel de captura	Nivel de unión a TL1A (Temprano)	Nivel de unión a TL1A (Tardío)
			Anticuerpo purificado		
320-179	Ninguna	Ninguna	301	61	56
320-492	L51Q	Ninguna	439	89	82
320-493	L51D	Ninguna	242	48	46
320-494	L51H	Ninguna	811	150	138
320-495	L51K	Ninguna	466	84	77
320-496	L51W	Ninguna	581	93	87
320-497	N52A	Ninguna	727	135	125
320-498	N52S	Ninguna	485	90	82
320-499	N52Q	Ninguna	551	122	113
320-500	N52D	Ninguna	472	69	53

5	320-501	N52H	Ninguna	533	118	108
	320-502	N52K	Ninguna	659	88	59
	320-503	N52W	Ninguna	484	41	6
	320-504	N52Y	Ninguna	500	88	65
	320-505	P52aA	Ninguna	570	118	110
10	320-506	P52aS	Ninguna	444	97	89
	320-507	P52aQ	Ninguna	181	27	24
	320-508	P52aD	Ninguna	203	19	12
	320-509	P52aH	Ninguna	290	52	47
	320-510	P52aK	Ninguna	289	44	33
15	320-511	P52aL	Ninguna	581	106	98
	320-512	P52aW	Ninguna	746	126	118
	320-513	P52aY	Ninguna	585	99	90
	320-514	N53A	Ninguna	516	96	88
	320-515	N53S	Ninguna	375	73	67
20	320-516	N53Q	Ninguna	461	92	86
	320-517	N53D	Ninguna	493	55	50
	320-518	N53H	Ninguna	882	169	153
	320-519	N53K	Ninguna	993	217	196
	320-520	N53L	Ninguna	1016	174	162
	320-521	N53W	Ninguna	830	166	152
	320-522	N53Y	Ninguna	693	141	129
	320-523	S54A	Ninguna	476	88	82
	320-524	S54Q	Ninguna	292	55	49
	320-525	S54D	Ninguna	437	33	17
	320-526	S54H	Ninguna	672	134	124
	320-527	S54K	Ninguna	578	146	136
	320-528	S54L	Ninguna	829	121	108

5	320-529	S54W	Ninguna	605	94	83
	320-530	S54Y	Ninguna	425	77	67
	320-531	G55A	Ninguna	331	66	61
	320-532	G55S	Ninguna	648	10	7
	320-533	G55Q	Ninguna	441	93	86
10	320-534	G55D	Ninguna	647	109	102
	320-535	G55H	Ninguna	637	126	115
	320-536	G55K	Ninguna	553	115	105
	320-537	G55L	Ninguna	717	133	123
	320-538	G55W	Ninguna	318	54	49
15	320-539	N56A	Ninguna	859	172	159
	320-540	N56S	Ninguna	500	100	92
	320-541	N56Q	Ninguna	504	94	84
	320-542	N56D	Ninguna	839	97	86
	320-543	N56H	Ninguna	597	138	126
20	320-544	N56K	Ninguna	690	120	112
	320-545	N56L	Ninguna	518	109	100
	320-546	N56W	Ninguna	341	67	61
	320-547*	N56Y	Ninguna	318	77	75
	320-548	T57A	Ninguna	335	74	68
20	320-549	T57S	Ninguna	269	50	45
	320-550	T57Q	Ninguna	635	112	103
	320-551	T57D	Ninguna	280	44	36
	320-552	T57H	Ninguna	595	104	97
	320-553	T57K	Ninguna	494	84	78
	320-554	T57L	Ninguna	506	66	51
	320-555	T57W	Ninguna	674	62	30
	320-556	T57Y	Ninguna	634	100	90

5	320-557	G58A	Ninguna	378	26	6
	320-558	G58S	Ninguna	463	3	2
	320-559	G58Q	Ninguna	535	9	5
	320-560	G58D	Ninguna	907	36	9
	320-561	G58H	Ninguna	539	14	6
10	320-562	G58K	Ninguna	326	2	1
	320-563	G58L	Ninguna	258	2	2
	320-564	G58W	Ninguna	345	72	67
	320-565	G58Y	Ninguna	545	43	12
	320-566	Y59A	Ninguna	720	120	110
15	320-567	Y59S	Ninguna	590	96	86
	320-568	Y59Q	Ninguna	688	115	107
	320-569	Y59D	Ninguna	408	79	73
	320-570	Y59H	Ninguna	435	79	72
	320-571	Y59K	Ninguna	394	78	72
20	320-572	A60S	Ninguna	459	98	90
	320-573	A60Q	Ninguna	338	67	62
	320-574	A60D	Ninguna	693	140	130
	320-575	A60H	Ninguna	581	121	110
	320-576	A60K	Ninguna	479	90	83
20	320-577	L51A	Ninguna	479	98	90
	320-578	L51Y	Ninguna	415	83	77
	320-579	N52L	Ninguna	214	46	41
	320-580	G55Y	Ninguna	261	51	47
	320-581	Y59L	Ninguna	337	70	65
	320-582	Y59W	Ninguna	453	67	52

Tabla 10: Experimento SPR - Corrida 8 - Anticuerpos anti-TL1A que se unen a TL1A. El * indica los anticuerpos que

5	fueron seleccionados para las pruebas de captura	Sustitución VH con relación a 320-179	Sustitución VL con relación a 320-179	Nivel de unión a TL1A (Temprano)	Nivel de unión a TL1A (Tardío)	
						Anticuerpo purificado
10	320-179	Ninguna	Ninguna	402	98	86
	320-583*	Ninguna	G30A, Y91W	404	108	103
	320-584*	Ninguna	L31S, Y91W	399	103	98
	320-585*	Ninguna	L31Q, Y91W	406	116	109
	320-586*	Ninguna	H34L, Y91W	405	108	103
	320-587*	N56Y	Y91W	402	123	122
	320-588*	N56Y	G30A	409	128	123
	320-589*	N56Y	L31S	399	120	109
15	320-590*	N56Y	L31Q	405	130	121
	320-591*	N56Y	H34L	399	132	124
	320-592*	N56Y	G30A, Y91W	408	128	129
	320-593*	N56Y	L31S, Y91W	405	126	124
	320-594*	N56Y	L31Q, Y91W	407	134	132
	320-595*	N56Y	H34L, Y91W	403	129	128

Tabla 11: Experimento SPR - Corrida 9 - Anticuerpos anti-TL1A que se unen a TL1A. El * indica los anticuerpos que fueron seleccionados para las pruebas del ensayo de potencia.

5	Anti-cuerpo	Sustitución VH con relación a 320-179	Sustitución VL con relación a 320-179	Nivel de captura	Nivel de unión a TL1A (Temprano)	Nivel de unión a TL1A (Tardío)
				Anticuerpo purificado		
10	320-179	Ninguna	Ninguna	402	108	98
	320-596	Ninguna	Y91F	405	95	85
	320-597	Ninguna	L31Q, Y91F	401	115	105
	320-598	Ninguna	H34L, Y91F	403	112	101
	320-599	Ninguna	L31S, Y91F	411	113	103
	320-600	Ninguna	G30A, Y91F	399	111	104
15	320-601*	N56Y	Y91F	409	121	120
	320-602	N56Y	L31Q, Y91F	399	131	125
	320-603	N56Y	H34L, Y91F	394	126	118
	320-605	N56Y	G30A, Y91F	399	125	120
	320-611*	N56Y	Y91W, G93K	397	125	127
	320-612	Ninguna	Y91W, G93Y	400	126	120
20	320-613*	N56Y	Y91W, G93Y	408	135	131
	320-614	N56Y	G93K	401	122	111
	320-615	N56Y	G93Y	393	113	108
	320-616	N56Y	G93A	396	120	112

Los anticuerpos que tenían niveles de de captura

similares o mejores que 320-179, así como valores para el Nivel de unión a TL1A (temprano) y para el Nivel de unión a TL1A (tardío), en un rango similar se emplearon en los ensayos de potencia. Estas variantes están indicadas mediante
5 sombreado en las Tablas 3-11. En la Figura 5 se muestra una comparación de la disociación medida por SPR para varios de los anticuerpos. Algunos de los anticuerpos se disociaban a una menor velocidad que la del anticuerpo parental 320-179.

2.2 Anticuerpos anti-TL1A con potencia mejorada en un
10 ensayo basado en células. Para evaluar si la disociación mejorada se correlacionaba con una potencia mejorada del anticuerpo purificado, las variantes se corrieron en el ensayo de actividad caspasa inducida por TL1A en células TF-1. Los anticuerpos potentes actúan por medio de la unión a
15 TL1A e inhibición de la activación por TL1A del receptor DR3. Este receptor dispara una vía de apoptosis en la cual se activan caspasas y pueden ser detectadas usando reactivos comerciales. En cada experimento, se comparó la variante del anticuerpo con 320-179 por mejoras en la potencia. Los
20 resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Ensayo de potencia de caspasa inducida por TL1A en células TF-1: Inhibición por los anticuerpos anti-TL1A.

5

Anti- cuerpo	Sustitución n VH con relación a 320-179	Sustitución VL con relación a 320-179	IC₅₀ del anticuerpo (µg/ml)	IC₅₀ de 320-179 (µg/ml)	Mejora
320-184	Ninguna	L79A	0,010	0,030	3
320-185	Ninguna	L79S	0,020	0,030	2

10

15

20

5

10

15

20

320-186	Ninguna	L79Q	0,030	0,030	1
320-187	Ninguna	L79D	0,020	0,040	2
320-188	Ninguna	L79H	0,010	0,040	4
320-189	Ninguna	L79K	0,110	0,040	0
320-190	Ninguna	L79W	0,020	0,040	2
320-191	Ninguna	L79Y	0,020	0,040	2
320-198	Ninguna	T24L	0,010	0,010	1
320-201	Ninguna	S25A	0,005	0,010	2
320-202	Ninguna	S25Q	0,010	0,010	1
320-205	Ninguna	S25K	0,020	0,030	2
320-207	Ninguna	S25W	0,007	0,020	3
320-209	Ninguna	S26A	0,040	0,020	1
320-211	Ninguna	S26D	0,010	0,030	3
320-213	Ninguna	S26K	0,070	0,030	0
320-219	Ninguna	S27D	0,020	0,030	2
320-226	Ninguna	S27aQ	0,030	0,020	1
320-229	Ninguna	S27aK	0,040	0,060	2
320-241	Ninguna	I27cA	0,020	0,010	1
320-244	Ninguna	I27cD	5,030	0,010	0
320-245	Ninguna	I27cH	0,540	0,010	0
320-263	Ninguna	A29K	0,003	0,010	3
320-267	Ninguna	G30A	0,010	0,040	4
320-277	Ninguna	L31S	0,003	0,010	3
320-278	Ninguna	L31Q	0,010	0,020	2
320-280	Ninguna	L31H	0,006	0,020	3
320-297	Ninguna	V33H	0,005	0,020	4
320-302	Ninguna	H34A	0,010	0,020	2
320-307	Ninguna	H34L	0,010	0,040	4

5	320-313	Ninguna	Q89H	0,020	0,030	2
	320-314	Ninguna	Q89K	0,020	0,030	2
	320-318	Ninguna	S90A	0,020	0,050	3
	320-326	Ninguna	Y91S	0,030	0,050	2
	320-328	Ninguna	Y91H	0,020	0,020	1
10	320-331	Ninguna	Y91W	0,002	0,020	10
	320-345	Ninguna	G93K	0,020	0,010	1
	320-361	Ninguna	L95D	0,010	0,010	1
	320-443	Y32K	Ninguna	0,060	0,060	1
	320-445	Y32W	Ninguna	0,030	0,060	2
15	320-463	N35A	Ninguna	0,020	0,050	3
	320-464	N35S	Ninguna	0,030	0,050	2
	320-477	S31H	Ninguna	0,030	0,040	1
	320-547	N56Y	Ninguna	0,004	0,040	10
	320-583	Ninguna	G30A, Y91W	0,003	0,080	27
20	320-584	Ninguna	L31S, Y91W	0,008	0,080	10
	320-585	Ninguna	L31Q, Y91W	0,003	0,040	13
	320-586	Ninguna	H34L, Y91W	0,002	0,050	25
	320-587	N56Y	Y91W	0,001	0,040	40
	320-588	N56Y	G30A	0,004	0,020	5
	320-589	N56Y	L31S	0,020	0,020	1
	320-590	N56Y	L31Q	0,006	0,020	3
	320-591	N56Y	H34L	0,002	0,020	10
	320-592	N56Y	G30A, Y91W	0,003	0,020	7
	320-593	N56Y	L31S, Y91W	0,004	0,060	15
	320-594	N56Y	L31Q, Y91W	0,005	0,060	12
	320-595	N56Y	H34L, Y91W	0,003	0,060	20
	320-601	N56Y	Y91F	0,002	0,020	10
	320-611	N56Y	Y91W, G93K	0,005	0,040	8
	320-613	N56Y	Y91W, G93Y	0,010	0,040	4

** Varios de los anticuerpos con mejores mayores que 10 veces de la potencia se corrieron en hasta $n = 7$ ensayos. Los resultados eran consistentes con los datos que se muestran en esta tabla. En la Figura 7 se muestran $n = 4$ réplicas de varios de los anticuerpos con potencia mejorada en comparación con 320-179.

Según se muestra en la Tabla 12 y en la Figura 6, varios de los anticuerpos evaluados de una sola sustitución tenían una potencia superior en comparación con 320-179. Entre todas las variantes de anticuerpos evaluadas de una sola sustitución dos mostraron una mejora de más de 10 veces en potencia en comparación con 320-179. Estas variantes eran 320-331 (que contenía una sustitución Y91W en la cadena liviana variable) y 320-547 (que contenía una sustitución N56Y en la cadena pesada variable) (Figura 6). Este resultado es inesperado, ya que típicamente la CDR3 de la VH del anticuerpo está involucrada predominantemente en la unión del anticuerpo, mientras por el contrario, la sustitución N56Y que se identificó tiene un efecto sustancial sobre la unión se encuentra en la CDR2 de la VH del anticuerpo. Cuando se elaboraban variantes que incorporaban ya sea Y91W de la VL o N56Y por separado en la VH con otras sustituciones que mejoraban la potencia, se obtenían anticuerpos altamente

potentes. Cuando la sustitución VL Y91W se combinaba con la sustitución VH N56Y en un anticuerpo, 320-587, la mejora en la potencia en comparación con 320-179 era de 40. En la Figura 7 se muestran cuatro experimentos repetidos diferentes que demuestran el aumento de la potencia de cuatro anticuerpos 320-587, 320-591, 320-592 y 320-601 en comparación con 320-179. Las secuencias de estos anticuerpos de potencia mejorada en comparación con 320-179 se muestran en la Figura 3 (cadena pesada variable) y en la Figura 4 (cadena liviana variable).

Se efectuó una comparación de la potencia de 320-587 comparado con otros anticuerpos anti-TL1A descritos con anterioridad. Estos anticuerpos descritos con anterioridad incluyen el anticuerpo 1681N que se describe en la Patente de los EE.UU. N°: 8.642.741 (la VH es la SEQ ID N°: 18; la VL es la SEQ ID N°. 26), el anticuerpo VH5/VL1 de la publicación de Patente de los EE.UU. N°: 2014/0308271 (la VH es la SEQ ID N°: 24; la VL es la SEQ ID N°: 17), el 1B4 humanizado descrito en la Patente de los EE.UU. N°: 8.263.743 (la VH es la SEQ ID N°: 74; la VL es la SEQ ID N°: 75) y 320-168 (también denominado C320-168) descrito en la publicación de Patente de los EE.UU. N°: 2014/0255302A1 (la VH es la SEQ ID N°: 181; la VL es la SEQ ID N°: 194). En la Figura 8 se muestra que 320.587 tiene una potencia superior en el ensayo

basado en células en comparación con estos anticuerpos descritos con anterioridad, volviéndolo el anticuerpo anti-TL1A más potente descrito.

2.3. Ensayos de competencia con los receptores DR3 y DcR3. Los anticuerpos que presentan una mayor potencia en comparación con 320-179 fueron examinados por su capacidad para inhibir la unión de TL1A a su receptor de señalización conocido, DR3, o a un receptor señuelo, DcR3. Todos los anticuerpos anti-TL1A evaluados mostraron inhibición de la unión de TL1A a DR3, en comparación con un control de isotipo (Figura 9). Esto confirma que los anticuerpos inhiben la actividad de TL1A mediante bloqueo de la interacción TL1A-DR3.

En experimentos previos descritos en la publicación de Patente de los EE.UU. N°: 2014/0255302A1 (Ejemplo 4), se evaluó el anticuerpo 320-179 (320-179) en un ensayo de competencia de receptores y se demostró que inhibe selectivamente la unión de TL1A a DR3 pero no a DcR3 (Figura 10). En los experimentos que se describen en la presente, en la Figura 10 se muestra nuevamente que 320-179 no inhibe la interacción de TL1A-DcR3. Esto se contrapone a los anticuerpos anti-TL1A mejorados evaluados. Los anticuerpos de potencia mejorada en el ensayo con células TF-1 (que se describe en la Sección 2.2), que incluyen el anticuerpo 320-

587, inhibieron consistentemente la interacción de TL1A-DcR3.

En resumen, el anticuerpo parental 320-179 pudo inhibir la interacción de TL1A-DR3 pero no la interacción de TL1A-DcR3. Varios anticuerpos con potencia mejorada, tal como 320-267 (la VH es la SEQ ID N°: 1; la VL es la SEQ ID N°: 11), 320-277 (la VH es la SEQ ID N°: 1, la VL es la SEQ ID N°: 12), 320-278 (la VH es la SEQ ID N°: 1; la VL es la SEQ ID N°: 13) y 320-591 (la VH es la SEQ ID N°: 3, la VL es la SEQ ID N°: 9), inhibieron la interacción de TL1a-DR3 pero no la interacción de TL1A-DcR3. Varios anticuerpos con potencia mejorada, tal como 320-331, 320-547, 320-583, 320-584, 320-585, 320-586, 320-587 y variantes de estos anticuerpos, pueden inhibir tanto la interacción de TL1A-DR3 como la interacción de TL1A-DcR3.

2.4. La reactividad cruzada entre especies de 320-587 fue evaluada por su capacidad para unirse al TL1A producido de manera recombinante de diferentes especies. El anticuerpo se unió al TL1A de todas las especies evaluadas (Figura 11). La unión del 320-587 al TL1A humano, de rata, cobayo, perro, gato, mono cinomolgo mostraba una velocidad de disociación lenta, indicativo de una gran interacción de afinidad. El anticuerpo se unió al TL1A de ratón y de conejo y tenía una velocidad de disociación rápida.

2.5. Modelos de eficacia preclínicos para evaluar los

anticuerpos anti-TL1A en los siguientes modelos de enfermedades en animales:

Asma: asma inducido por alergenos - se sensibiliza un roedor (ratón, rata o cobayo) mediante una inyección intradérmica de ovalbúmina (OVA), en especial OVA derivado de 5 huevos de gallina, más alúmina y luego se lo expone a OVA aerosolizada mediante nebulizaciones por lo menos 2 semanas más tarde, causando síntomas tipo asma que incluyen hiperreactividad de las vías respiratorias, influjo de 10 eosinófilos y mayor producción de citoquinas (por ejemplo, Hylkema *et al.*, 2002, *Clin. Exp. Immunol.* 129: 390-96). Este modelo se podría modificar mediante exposiciones repetidas para presentar un perfil de enfermedad más crónico con una mayor remodelación de las vías respiratorias e inducción de 15 fibrosis (por ejemplo, Bos *et al.*, 2007, *Eur. Respir. J.* 30: 653-661). También se pueden usar alergenos alternativos, tal como ácaro del polvo doméstico, (por ejemplo, Lambert *et al.*, 1998, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157: 1991-9). Como alternativa, se puede sensibilizar un primate no humano (por 20 ejemplo, macaco cinomolgo) y someterlo a un desafío con un antígeno ambiental, tal como *Ascaris suum*, que conduce a hiperreactividad de las vías respiratorias, influjo de eosinófilos y mayor producción de citoquinas (por ejemplo, Wegner *et al.*, 1991, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 87: 835-41).

EPOC: Inflamación de las vías respiratorias inducida por inhalación de humo - se expone un roedor (ratón, rata o cobayo) al humo de cigarrillo 3-7 veces por semana durante por lo menos 4 semanas causando una enfermedad pulmonar similar al EPOC, caracterizado por acumulación de neutrófilos en pulmón, una mayor producción de citoquinas inflamatorias, fibrosis de pulmón e hipertensión pulmonar (por ejemplo, Davis *et al.*, (2012) *PLoS One* 7: e33304). Se puede inducir una forma más severa de la enfermedad mediante incorporando una infección bacteriana o viral repetida en los pulmones durante la exposición al humo (por ejemplo, Li et al., (2012) *Biol. Pharm. Bull.*, 35: 1752-60). Los roedores con EPOC inducida por humo serán tratados con los anticuerpos anti-TL1A y examinados por la eficacia del tratamiento.

Fibrosis pulmonar: Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina - se tratarán roedores (ratón, rata o cobayo) con bleomicina ya sea mediante instilación intratraqueal/intranasal o inyección intravenosa una o dos veces por semana durante por lo menos 3 semanas. Este tratamiento induce una fibrosis pulmonar significativa y estable (por ejemplo, Pinart et al., (2009) *Resp. Physiol. Neurobiol.*, 166: 41-46). Los roedores con fibrosis pulmonar inducida por bleomicina serán tratados con los anticuerpos anti-TL1A y examinados por la eficacia del tratamiento.

Fibrosis quística: Modelo en hurón de noqueo de CFTR - los hurones homocigotas para el noqueo de genes, o mutaciones conocidas relacionadas con la enfermedad, del CFTR (gen causal de la fibrosis quística) desarrollan espontáneamente una enfermedad tipo fibrosis quística caracterizada por obstrucción con mucus de las vías respiratorias, atelectasis, neumonía intersticial e infecciones pulmonares repetidas con colonización bacteriana progresiva del pulmón (por ejemplo, Sun *et al.*, (2014) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50: 502-12). Los hurones CFTR^{-/-} serán tratados con los anticuerpos anti-TL1A y examinados por la eficacia del tratamiento.

Síndrome de intestino irritable: Hipersensibilidad visceral inducida por estrés - Se inducirá estrés en ratas ya sea por separación materna-neonatal (por ejemplo, Coutinho *et al.*, (2002) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282: G307-16) o por restricción de adultos (por ejemplo, Shen *et al.*, (2010) *J. Neurogastroenterol. Motil.*, 16: 281-90). Se espera que esto produzca una motilidad colónica alterada e hipersensibilidad visceral similar a lo observado en los pacientes con IBS. Las ratas estresadas serán tratadas con los anticuerpos anti-TL1A y examinadas por la eficacia del tratamiento.

Artritis reumatoide: Artritis inducida por colágeno - se inmunizarán roedores (ratón, rata o cobayo) y recibirán

exposiciones a colágeno en adyuvante. Los animales desarrollan hinchazón y eritema bilateral de las patas, infiltraciones inflamatorias en el área de la articulación y daño de la articulación (por ejemplo, Bendele *et al.*, (1999) *Toxicol. Pathol.* 27: 134-42). Los roedores con artritis inducida por colágeno serán tratados con los anticuerpos anti-TL1A y examinados por la eficacia del tratamiento.

Esofagitis eosinofílica: Esofagitis eosinofílica intranasal inducida por *Aspergillus fumigatus*. Los ratones expuestos a repetidas instilaciones intranasales de *A. fumigatis* desarrollan una marcada eosinofilia esofágica, displasia e hiperplasia epitelial, y gránulos de eosinófilos libres (por ejemplo, Mishra *et al.*, (2001) *J. Clin. Invest.* 107: 83-90). De manera similar, una exposición repetida a ovalbúmina en aerosol sobre un período de dos semanas en cobayos sensibilizados causa eosinofilia esofágica con infiltración de ambos eosinófilos y mastocitos en la capa epitelial (por ejemplo, Liu *et al.*, (2015) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 308: G482-488). Los ratones o cobayos con esofagitis eosinofílica serán tratados con los anticuerpos anti-TL1A y examinados por la eficacia del tratamiento.

2.6. El uso de anticuerpos anti-TL1A para detectar muestras que contienen los anticuerpos anti-TL1A de la

divulgación se puede emplear para detectar TL1A en muestras humanas. Se usó el 320-587 para detectar TL1A humano secretado por las PBMC humanas estimuladas con complejos inmunes (Figura 13) en un formato ELISA. El 320-587 también
5 se usó para detectar una población de PBMC humanas que expresan un TL1A de membrana sobre su superficie en experimentos de citometría de flujo (Figura 14).

2.7. Mediciones de afinidad de la unión del anticuerpo anti-TL1A al TL1A humano mediante un ensayo de exclusión
10 cinética. Tiempo hasta alcanzar el equilibrio con 320-587 como CBP: Primero, se midió el índice de asociación K_{on} para la interacción de 320-587/TL1A. Brevemente, se preparó una solución mediante mezclado de 320-587 y TL1A, y se retiraron alícuotas en varios puntos de tiempo sobre un período de 3
15 horas. El 320-587 libre se capturó haciendo pasar la solución sobre una columna empaquetada con esferas de Sepharose recubiertas con TL1A 20 $\mu\text{g/ml}$. El 320-587 capturado se detectó con un anticuerpo anti-humano conjugado con Alexa Fluor® 647 (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Este ensayo se repitió dos veces
20 dando índices de K_{on} de entre $8,35 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ y $7,45 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$, con un índice K_{on} promedio de $7,90 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$. El índice K_{on} se usó luego para estimar la cantidad de tiempo necesaria para alcanzar el equilibrio a varias concentraciones del 320-587 usando la herramienta de curva de unión teórica provista en

el sitio de internet Sapidyne (www.Sapidyne.com).

Determinación de KD con 320-587 como CBP. El CBP, 320-587, se diluyó en solución amortiguadora de ensayo (DPBS suplementado con BSA 1 mg/ml) hasta concentraciones finales de 15, 50 y 150 pM. El titulante, el TL1A humano, se diluyó en solución amortiguadora de ensayo para crear una serie de concentraciones de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 pM. Se dejó que las curvas que contenían ya sea 50 ó 150 pM del 320-587 alcanzaran el equilibrio en un incubador a 25 °C durante 2 días usando el tiempo hasta alcanzar el equilibrio determinado previamente. Se dejó que las curvas que contenían 320-587 15 pM alcanzaran el equilibrio en un incubador a 25 °C durante 3 días. Después del período de equilibrio, se cuantificó la fracción libre de 320-587 en cada reacción como se describió previamente. Los valores de K_D se determinaron usando un análisis de n-curvas de las curvas del equilibrio generadas con 15, 50 y 150 pM de 320-587.

Tiempo hasta alcanzar el equilibrio con TL1A como CBP:
El tiempo hasta alcanzar el equilibrio en esta orientación se estimó usando el índice K_{on} para la interacción de 320-587/TL1A, determinado como se describió previamente en 2.8. En este formato, la fracción libre de TL1A se capturó haciendo pasar la solución sobre una columna empaquetada con

esferas de PMMA recubiertas con 30 $\mu\text{g/ml}$ de 320-587. El TL1A capturado se detectó con un anticuerpo anti 6x-his DyLight 650 (0,75 $\mu\text{g/ml}$). Este ensayo se repitió dos veces dando índices de K_{on} de entre $6,11 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$ y $5,74 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$, con un índice K_{on} promedio de $5,93 \times 10^5 \text{ Ms}^{-1}$.

Determinación de K_D con TL1A como CBP: El CBP, el TL1A humano, se diluyó en solución amortiguadora de ensayo hasta concentraciones finales de 30, 100 y 300 pM. El titulante, 320-587, se diluyó en solución amortiguadora de ensayo para crear una serie de concentraciones de 0,05, 0,15, 0,5, 1,5, 5, 15, 50, 150, 500, 1500 y 5000 pM.

Se dejó que todas las curvas alcanzaran el equilibrio en un incubador a 25 °C durante 3 días usando el tiempo hasta alcanzar el equilibrio determinado previamente. Después del período de equilibrio, se cuantificó la fracción libre de TL1A en cada reacción como se describió previamente. Los valores de K_D se determinaron usando un análisis de n-curvas de curvas de equilibrio generadas con 30, 100 y 300 pM de TL1A.

Se observó una buena concordancia entre los dos métodos KinExA, así como un % de error relativamente bajo. El valor de K_D para la interacción de TL1A con 320-587 determinado usando 320-587 como CBP era de $40,97 \pm 8,33 \text{ pM}$ (Tabla 13), en tanto el valor de K_D obtenido usando TL1A como CBP era de

41,52 $\pm$ 13,5 pM (Tabla 14).

Tabla 13: Afinidad: esferas de Sepharose recubiertas con TL1A; 320-587 como CBP.

N° ensayo	K _D (pM)	% de error
1	40,43	4,57
2	52,03	5,61
3	46,31	4,76
4	32,42	3,74
5	33,66	3,9
Promedio	40,97	
DE	8,33	
%CV	20	

Tabla 14: Afinidad: esferas de PMMA recubiertas con 320-587; TL1A como CBP.

N° ensayo	K _D (pM)	% de error
1	33,39	5,33
2	57,1	5,51
3	34,07	3,9
Promedio	41,52	
DE	13,5	
%CV	33	

3.0. Modelos de eficacia preclínicos para evaluar los anticuerpos anti-TL1A.

3.0.1. Asma.

5 Asma aguda inducida por ovalbúmina en ratas. Se sensibilizaron ratas Brown-Norway con OVA mediante inyección i.p. el día 0 y luego fueron sometidas a exposiciones de OVA en aerosol diariamente los días 35-42. Las ratas fueron tratadas con el anticuerpo 320-587 o con vehículo mediante
10 inyección i.v. los días 14, 21, 28 y 35. Se evaluó el fluido de lavaje broncoalveolar (BALF) por células totales y diferenciadas el día 43. Se encontró que el tratamiento reduce significativamente los eosinófilos en el BALF (Figura 15).

15 Asma crónica inducida por ovalbúmina en ratas. Se sensibilizaron ratas con OVA más alúmina mediante inyección i.p. los días 0 y 7, y luego fueron sometidas a exposiciones con OVA en aerosol dos veces por semana durante 3 semanas comenzando el día 14 hasta el día 31, y por 5 días
20 consecutivos entre los días 37 y 42. Los animales fueron tratados con el anticuerpo 320-587 o con vehículo por vía i.v. los días 24, 29, 34 y 39. El BALF fue evaluado por células totales y diferenciadas, y un conjunto de citoquinas el día 43. Se tiñeron secciones de pulmón con hematoxilina y

eosina (H&E) y ácido periódico de Schiff (PAS) y fueron evaluadas por numerosas patologías. El tratamiento con 320-587 disminuyó significativamente los eosinófilos y macrófagos en el BALF (Figura 17A y 17B), IL-4 e IL-13 en el BALF (Figura 17C), hiperplasia de células mucosas (Figura 17D) y el espesor de la capa de epitelio bronquial (Figura 17E), en comparación con el vehículo.

Asma aguda inducida por ovalbúmina en cobayos. Se sensibilizaron cobayos macho Dunkin Hartley con ovalbúmina y a continuación fueron sometidos a cirugía para instalar un catéter con balón para medir la función del pulmón y las reacciones asmáticas tempranas y tardías. El día 16, 20, 24 y 28, los animales fueron tratados por vía i.p. con el anticuerpo 320-587 o con vehículo. La exposición de ovalbúmina (0,05-0,1%) en aerosol se aplicó 30 minutos después del último tratamiento. La sensibilidad de las vías respiratorias (AHR) a histamina se midió 24 hs antes de la exposición, 6 hs después de la exposición (directamente después de la reacción asmática temprana) y 24 hs después de la exposición (directamente después de la reacción asmática tardía). También se registraron la naturaleza y el tamaño de las reacciones asmáticas temprana y tardía mediante registro en línea de la función pulmonar por todo el período 24 hs. Los animales fueron sacrificados 25 hs después de la

exposición y de realizar el lavaje broncoalveolar. El BALF fue evaluado por células totales y diferenciadas. El tratamiento con 320-587 disminuyó significativamente tanto a los eosinófilos como a los macrófagos en BALF (Figuras 16A y 16B), así como alivió la AHR después de la reacción asmática temprana (Figura 16C) y la magnitud global de la reacción asmática temprana (Figura 16D), en comparación con el vehículo.

Asma crónica inducida por ovalbúmina en cobayos. Se sensibilizaron cobayos macho Dunkin Hartley a ovalbúmina, y 4 semanas después fueron sometidos a exposiciones con ovalbúmina semanalmente por 12 semanas. La exposición a ovalbúmina (0,05-0,5%) se aplicó mediante inhalación de una solución aerosolizadas hasta que se observó obstrucción de las vías respiratorias. Los animales fueron tratados con el anticuerpo 320-587 o con vehículo por vía i.p. cada 5 días comenzando la semana 8 con las exposiciones a ovalbúmina. Se midió la función de las vías respiratorias por medio de la sensibilidad de las vías respiratorias a la histamina, antes de la exposición inicial, 24 horas antes de la exposición final y 6 horas después de la exposición final. Aunque no se observó ningún efecto sobre la AHR inducida por la exposición a histamina, el anticuerpo 320-587 disminuyó significativamente la respuesta alérgica a OVA, ya que fueron

necesarias dosis progresivamente crecientes de OVA para inducir obstrucción de las vías respiratorias (Figura 18).

Se cree que las diferencias en el efecto terapéutico del anticuerpo observadas en los modelos de asma aguda y crónica en cobayos son una función del propio modelo. Se cree que en el modelo crónico, el grado de AHR disminuye en el tiempo y, por ende, se vuelve menos sensible al tratamiento. En el arte, generalmente se usa el modelo agudo para observar los efectos del compuesto sobre la sensibilidad de las vías respiratorias, y generalmente se usa el modelo crónico para observar los efectos del compuesto sobre la remodelación de las vías respiratorias. Las evaluaciones de remodelación están en curso actualmente. Sin embargo, fue sorprendente observar que los anticuerpos tienen un efecto sobre la respuesta al alérgeno - si bien el anticuerpo no afectó sustancialmente la AHR (respuesta a histamina) en esta etapa, disminuyó significativamente la respuesta alérgica directa al antígeno.

3.0.2. Enfermedad de intestino inflamatorio

Colitis inducida por TNBS en ratas: Se trataron ratas con una sola dosis de ácido trinitrobencensulfónico en etanol mediante una dosis de instilación intrarrectal. Los animales control solamente recibieron un volumen equivalente de etanol. Los animales desarrollaron, sobre un período de 7

días, colitis focal caracterizado por ulceración del colon con infiltrados inflamatorios y grados variables de fibrosis (por ejemplo, Wirtz *et al.*, (2007) *Nat. Protoc.* 2: 541-546). La administración de 320-587 redujo significativamente
5 numerosos indicadores de la enfermedad incluyendo el espesor del colon (Figura 12A), el número y la severidad de adhesiones (Figura 12B), y el número y la severidad de constricciones (Figura 12C) que conducen a una enfermedad significativamente más leve que en los animales tratados ya
10 sea con vehículo o con un anticuerpo irrelevante adaptado al isotipo (Figura 12D). También se observó disminución en la fibrosis de colon (Figura 19) en los animales tratados con 320.587.

Comparación de la enfermedad después de 7 y 14 días de
15 colitis inducida por DNBS en ratas. Se indujo colitis como se describió precedentemente usando ácido dinitrobencensulfónico (DNBS) en lugar de TNBS, y las ratas usadas en los experimentos con DNBS eran ratas Wistar. Las animales fueron tratados con el anticuerpo 320-587 o con vehículo por vía
20 i.v. los días 1 y 8. Los grupos fueron evaluados por la colitis 7 y 14 días después del DNBS y se comparó la severidad de la enfermedad entre los dos puntos de tiempo. El tratamiento con el anticuerpo 320-587 tuvo un efecto limitado para el día 7, pero para el día 14 los animales tratados con

el anticuerpo 320-587 mostraron una mejora significativa en el peso y la longitud del colon (Figura 20A), fibrosis (Figura 20B), infiltrados inflamatorios (Figura 20C) y daño del colon (Figura 20D). Las secciones representativas de colon con áreas de úlcera (Figura 20E) muestran la extensión de reparación del daño y reducción de la fibrosis tras 14 días. Tanto a los 7 como a los 14 días, los animales tratados con vehículo mostraron extensos infiltrados inflamatorios y fibrosis con una pérdida significativa de la arquitectura intestinal. Por el contrario, los animales tratados con 320-587 mostraron infiltrados inflamatorios significativos, fibrosis y pérdida de la arquitectura intestinal a los 7 días pero estos efectos son revertidos mayormente a los 14 días.

Se cree que las diferencias observadas en los efectos terapéuticos del anticuerpo en los modelos con TNBS y DNBS surgen debido al uso de diferentes cepas de ratas (Sprague-Dawley para TNBS versus Wistar para DNBS). Cada cepa de rata mostraba diferencias en sus respuestas a las exposiciones inmunológicas de modo tal que se cree que la cinética de la respuesta en estos modelos es diferente. Asimismo, ambos TNBS y DNBS son estructuralmente diferentes y se considera que inducen variaciones en el estado de la enfermedad.

Colitis crónica (21 día) inducida por DSS en ratas. Se administró sulfato sódico de dextrano (DSS) a ratas a una

concentración de 5% p/v en el agua para beber durante 7 días, luego a 2% p/v en el agua para beber durante otros 14 días. Los animales desarrollaron diarrea, inflamación colónica difusa, hiperplasia de células mucosas y daño y ulceración del epitelio de las criptas (por ejemplo Randhawa *et al.*, (2014) *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 18: 279-88). Las ratas fueron tratadas con el anticuerpo 320-587 o con vehículo mediante inyección intravenosa los días 5, 12 y 19. Los animales se pesaron y fueron evaluados por la enfermedad clínica (diarrea y sangre oculta) diariamente y el peso y la longitud del colon fueron evaluados el día 21. El tratamiento con el anticuerpo 320-587 revirtió significativamente la inducción por DSS mediante un retardo del aumento de peso (Figura 21A), signos clínicos de enfermedad mejorados (Figura 21B) y el peso y la longitud del colon mejorados (Figura 21C).

Inducción de citoquinas intraperitoneales por el TL1A humano recombinante. La inyección intraperitoneal del TL1A de ratón recombinante puede inducir producción de citoquinas inflamatorias tal como la IL-5. En este estudio, los ratones recibieron una sola dosis de anticuerpo 320-587 o de vehículo, luego una hora más tarde fueron tratados con el TL1A humano recombinante (rhTL1A) 40 µg/ratón. Seis horas después de la dosificación con rhTL1A, se efectuó un lavaje

peritoneal y el fluido peritoneal fue evaluado por citoquinas y quimioquinas mediante un ensayo Multiplex. El tratamiento con el anticuerpo 320-587 disminuyó significativamente las concentraciones peritoneales de las citoquinas G-CSF, IL-1b, IL-5, IL-6, IL-17 y de las quimioquinas IP-10, KC, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, MIP-2 (Figura 22).

La divulgación no se limita a las formas de realización que se describieron y ejemplificaron previamente, sino que se pueden efectuar variaciones y modificaciones de la misma dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.