

ANTICUERPOS Y POLIPÉPTIDOS DIRIGIDOS CONTRA CD127

[1] La invención pertenece al área de los polipéptidos o anticuerpos que resultan de utilidad en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico con diana en CD127, la cadena alfa del receptor de IL7, y proporciona en particular anticuerpos monoclonales humanizados contra CD127, particularmente CD127 humano, sus usos terapéuticos y aplicaciones en diagnóstico.

Breve descripción de la invención

[2] La cadena (o subunidad) alfa del receptor para la interleuquina-7 (IL-7), se designa como CD127 o p90 IL-7R o IL-7R α (a veces también se indica como IL-7Ra). En un aspecto particular, los anticuerpos, especialmente los anticuerpos monoclonales, que se proporcionan en la presente se dirigen contra la cadena alfa del receptor para la IL-7 humana expresada en células humanas. En un aspecto particular, los anticuerpos proporcionados en la presente tienen propiedades antagonistas para la interacción IL-7-IL-7R, pueden presentar actividad citotóxica contra células CD127 positivas, pero no aumentan la maduración de las células dendríticas (DC, *por sus siglas en inglés*) inducida por la TSLP. En particular, los anticuerpos proporcionados en la presente reconocen un epítipo de CD127 humano que comprende secuencias del sitio 2b de CD127; en particular, el epítipo comprende secuencias de CD127 humano del dominio D1 y del sitio 2b de CD127; en particular, el epítipo comprende al menos una secuencia de D1 y al menos una secuencia del sitio 2b, preferentemente de la tercera lámina beta del sitio 2b de CD127. Como alternativa o de manera adicional, en un aspecto particular, los anticuerpos que se proporcionan en la presente no inducen la internalización de CD127 y/o inhiben la internalización de CD127 inducida por IL7. En un aspecto particular, los anticuerpos que se proporcionan en la presente son humanizados y comprenden al menos 80%, y preferiblemente al menos 84%, o al menos 85% de residuos humanos. En un aspecto particular, los anticuerpos proporcionados en la presente tienen un rápido efecto sobre las células T efectoras de memoria, un efecto de larga duración sobre las células T efectoras de memoria, o preferiblemente un efecto rápido y de larga duración sobre las células T efectoras de memoria. En un aspecto particular, los anticuerpos que se proporcionan en la presente permiten una producción eficiente. En un aspecto particular, los niveles de expresión de CD127, IL-7 y/o TSLP pueden medirse para evaluar la probabilidad de respuesta, en particular utilizando los anticuerpos anti-CD127 que se proporcionan en la presente. Además de los anticuerpos provistos en la presente, en particular como herramientas para la producción de anticuerpos y/o para usos similares a dicho anticuerpos, se proveen polipéptidos, especialmente dominios

variables de la cadena liviana anticuerpos o cadenas livianas anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y moléculas miméticas de anticuerpos de tales anticuerpos y polinucleótidos.

[3] Los inventores han buscado obtener anticuerpos humanizados mejorados en comparación con los anticuerpos N13B2-h1, N13B2-h2 y N13B2-h3 que se divulgan en la WO 2015/189302. Aunque se sabe que algunos residuos en las secuencias del marco del dominio variable, incluyendo los residuos en la zona Vernier, residuos canónicos, residuos en la interfaz VH/VL, etc., son críticos en la estructura de un anticuerpo y no deben ser mutados a fin de preservar la actividad biológica y bioquímica de un anticuerpo, sorprendentemente los inventores han descubierto que algunas mutaciones dentro de la secuencia del marco del dominio variable de la cadena liviana de N13B2, incluidos algunos de tales residuos críticos, permiten aumentar el contenido de residuos humanos (superior a N13B2-h3 y hasta el 86,3%) y mejorar la producción (hasta 4 veces superior a la de N13B2-h3), mientras se conservan todas las características funcionales.

[4] Estas mutaciones consisten en 16 sustituciones de aminoácidos dentro de la secuencia del marco del dominio variable de la cadena liviana de N13B2 y, en particular, adicionalmente en la sustitución del residuo valina en la posición 48 por un residuo leucina (V48L) y/o en la sustitución del residuo fenilalanina en la posición 87 por un residuo tirosina (F87Y). Estas posiciones, y cualesquiera posiciones de aminoácidos con las cadenas de anticuerpos provistas en la presente, a menos que se indique de otro modo, son proporcionadas mediante numeración de Kabat. En la presente se proporcionan dominios variables de la cadena liviana del anticuerpo que consisten en las siguientes secuencias:

- SEQ ID NO: 9 (que incluye dichas 16 sustituciones de aminoácidos –siendo designado dicho dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo en lo sucesivo como N13B2-hVL3);
- SEQ ID NO: 10 (que incluye dichas 16 sustituciones de aminoácidos y adicionalmente con mutación V48L –siendo designado dicho dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo en lo sucesivo como N13B2-hVL4);
- SEQ ID NO: 11 (que incluye dichas 16 sustituciones de aminoácidos y adicionalmente con mutación F87Y –siendo designado dicho dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo en lo sucesivo como N13B2-hVL5); y
- SEQ ID NO: 12 (que incluye dichas 16 sustituciones de aminoácidos y adicionalmente con ambas mutaciones, V48L y F87Y –siendo designado dicho dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo en lo sucesivo como N13B2-hVL6).

[5] Así, el dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo designado en la presente como N13B2-hVL3, comprende las CDR de N13B2-h3, dichas 16 sustituciones de aminoácidos y los residuos originales de N13B2 en las posiciones críticas 48 y 87 (es decir, respectivamente, V y F) dentro de las secuencias de marco humanas y tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 9. El dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo mejorado preferido que se proporciona en la presente, designado como N13B2-hVL6, que también comprende ambas mutaciones V48L y F87Y, consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 12.

[6] El experto en la técnica no habría esperado que dichas mutaciones, particularmente en dichas posiciones en los marcos del dominio variable de la cadena liviana, dejaran no afectada la afinidad del anticuerpo con CD127: V48 es un residuo canónico y F87 está situado en la interfaz VH/VL; se espera que la mutación de tales residuos, como conoce el experto en la técnica y se analiza, por ejemplo, en Clark, 2014, afecte la afinidad y/o la estabilidad del anticuerpo. Tal como se lo emplea en esta memoria, el término residuo “canónico” se refiere a un residuo en una CDR o marco que define una estructura de CDR canónica particular como es definida por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901- 907 (1987); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 227:799 (1992). Según Chothia *et al.*, las porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos tienen conformaciones de cadena principal del péptido casi idénticas a pesar de la gran diversidad en el nivel de la secuencia de aminoácidos. Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de la cadena principal del péptido para un segmento contiguo de residuos de aminoácidos que forman un bucle. No era previsible que la introducción de las mutaciones divulgadas en ambas posiciones diera como resultado una mejor producción, a la vez que se preservan las características de unión, y ventajosamente otras características funcionales de los anticuerpos.

[7] En consecuencia, en la presente se proporciona un polipéptido que resulta útil en particular para la producción de estos anticuerpos, especialmente un dominio variable de cadena liviana de anticuerpo o una cadena liviana de anticuerpo, que consiste en una secuencia, en particular de hasta 250 aminoácidos, que comprende, o consiste en, la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; o SEQ ID NO: 12, o un fragmento de unión a antígeno o molécula mimética del anticuerpo, tal como se define más adelante. En un aspecto particular, la invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos de unión a antígeno, que se proporcionan en la presente, particularmente anticuerpos monoclonales humanizados, que específicamente se unen a CD127, particularmente a CD127 humano y comprenden:

- una cadena liviana de anticuerpo que comprende, o un dominio variable de la cadena liviana de anticuerpo que consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; en particular la SEQ ID NO: 12; y
- un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo que comprende las tres CDR que consisten en las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; y SEQ ID NO: 3; en particular un dominio variable de la cadena pesada de anticuerpo que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos de unión a antígeno, que se proporcionan en la presente, particularmente anticuerpos monoclonales humanizados, que específicamente se unen a CD127, particularmente a CD127 humano y comprenden:

- un dominio variable de la cadena liviana que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, particularmente SEQ ID NO: 12; y
- un dominio variable de la cadena pesada que comprende las tres CDR que consisten en las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; en particular un dominio variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

[8] En un aspecto particular, el anticuerpo proporcionado en la presente comprende una cadena liviana con un dominio variable como se indicó previamente y un dominio constante que consiste en una secuencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 27 o 28, preferiblemente la SEQ ID NO: 27, y una cadena pesada con un dominio variable, como se indicó anteriormente, y un dominio constante que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 26.

[9] En la presente también se proporciona un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de hasta 250 aminoácidos, en particular de hasta 217, de hasta 214, de hasta 211, más particularmente de hasta 200, de hasta 175, de hasta 150, de hasta 135, de hasta 120, de hasta 107 e incluso más particularmente de hasta 100, de hasta 90, de hasta 80, de hasta 74, de hasta 70, de hasta 60 aminoácidos, donde dicha secuencia comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- SEQ ID NO: 9 (CDRs de N13B2-h3 dentro de las secuencias de marco humano);
- SEQ ID NO: 10 (CDRs de N13B2-h3 dentro de las secuencias de marco humano, incluida la mutación V48L);

- SEQ ID NO: 11 (CDRs de N13B2-h3 dentro de las secuencias de marco humano, incluida la mutación F87Y);
- SEQ ID NO: 12 (CDRs de N13B2-h3 dentro de las secuencias de marco humano, que incluye ambas mutaciones, V48L y F87Y); y
- un fragmento del mismo de unión a antígeno, particularmente dicho fragmento que comprende tres CDR que consisten en las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, más particularmente un fragmento que comprende al menos 74 aminoácidos que consisten en los aminoácidos 24 a 97 de la SEQ ID NO: 12.

[10] En la presente también se proporcionan los polinucleótidos que codifican los polipéptidos proporcionados en la presente, en particular los anticuerpos o fragmentos de los mismos de unión a antígeno de acuerdo con la invención. En particular, dichos polinucleótidos codifican polipéptidos que comprenden, o consisten en, una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en las SEQ ID NO: 9 a 12, y también codifican polipéptidos que comprenden, o consisten en, las secuencias seleccionadas entre las SEQ ID NO: 1 a 3, en particular la SEQ ID NO: 7, y también pueden codificar polipéptidos que comprenden, o consisten en, las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 26 a 28. En particular, dichos polinucleótidos comprenden, o consisten en, la combinación de al menos dos secuencias de ácido nucleico (moléculas) aisladas: una primera molécula de ácido nucleico aislada que comprende o consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en las SEQ ID NO: 15 a 18; en particular, la SEQ ID NO: 18; comprendiendo, o consistiendo en, dicha combinación también en una molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o consiste en, una segunda secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 13 y las SEQ ID NO: 29 a 31, en particular la SEQ ID NO: 13.

[11] En particular, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende un dominio variable de la cadena liviana de anticuerpo o una cadena liviana de anticuerpo, comprendiendo dicho polipéptido al menos 84% y más en particular al menos 85% de residuos humanos. Dicho polipéptido puede ser un fragmento de unión a antígeno o una molécula mimética de anticuerpo, que se divulga en la presente.

[12] En la presente también se proporcionan composiciones que comprenden dichos polipéptidos, en particular dominios variables de cadena liviana de anticuerpo o cadenas livianas de anticuerpo, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o moléculas miméticas de anticuerpo, métodos para la obtención de dichos anticuerpos, moléculas de ácido nucleico que

codifican dichos polipéptidos y anticuerpos, y usos de dichos polipéptidos, anticuerpos y composiciones.

[13] En consecuencia, los polipéptidos, los dominios variables de cadena liviana de anticuerpo, las cadenas livianas de anticuerpo, los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno, las moléculas miméticas de anticuerpos y la composición proporcionada en la presente pueden estar destinados y/o resultar adecuados para utilizarlos con el fin de poner remedio a una afección diagnosticada en un paciente humano que es producto de patogénesis relacionadas con la linfopoyesis, cuando las vías de señalización de IL-7 contribuyen a dicha patogénesis, especialmente cuando es indeseable un incremento en la maduración, más precisamente la regulación positiva de las moléculas co-estimuladoras, de células dendríticas.

Descripción detallada de la invención

Bioquímica

[14] CD127 es común para el receptor de IL-7 (IL-7R) y el receptor TSLP (TSLPR). El IL-7R está constituido por un heterodímero de CD127 y la cadena gamma común (γ c) de los receptores de interleuquina. En la presente y en la literatura se suele hacer referencia a la cadena gamma común γ c como CD132. IL-7R se une mediante interleuquina 7. El receptor de TSLP es un heterodímero de CD127 y factor 2 similar al receptor de citoquina (CRLF2, *por sus siglas en inglés*). El receptor de TSLP se une mediante TSLP. En la literatura, el TSLPR se utiliza a veces para designar tanto la cadena CRLF2 del receptor como el complejo CD127/CRLF2. A fin de evitar confusiones, en el texto que sigue la sigla TSLPR normalmente designa el complejo.

[15] CD127 (número de acceso Swiss-Prot P16871) puede existir en cuatro isoformas. La isoforma canónica, también denominada H20 (Swiss-Prot P16871.1) es una proteína transmembrana de paso único y tiene 459 aminoácidos que consisten, desde el extremo N terminal al extremo C terminal, en un péptido señal de 20 aminoácidos, un dominio extracelular de 219 aminoácidos, un dominio transmembrana de 25 aminoácidos y un dominio intracelular de 195 aminoácidos. Otras isoformas comparten la secuencia de todo (o la mayor parte de) el dominio extracelular de H20 y exhiben variadas secuencias del extremo C terminal. Las isoformas 2 y 4 son secretadas (Swiss-Prot P16871-4 y P16871-3), mientras que la isoforma 3 (Swiss-Prot P16871-2) también es una proteína transmembrana. Se ha informado que CD127 tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 21, y su dominio extracelular, cuando se elimina el péptido señal, tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 22. A menos que se indique lo contrario, la

numeración utilizada en este documento para los aminoácidos de CD127 es la numeración de la SEQ ID NO: 22.

[16] CD127 es un receptor de Homología de Receptores de Citoquina clase I (CRH I, *por sus siglas en inglés*). Como es bien sabido en la técnica, el dominio extracelular de estos receptores consiste en dos dominios fibronectina 3, denominados D1 y D2. La estructura cristalográfica precisa de CD127 ha sido publicada y analizada, por ejemplo, en McElroy *et al.*, 2009; McElroy *et al.*, 2012 y Walsh, 2012 y, en particular, se ha revelado como datos de la estructura de proteínas en la base de datos de Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB), con el número de acceso 3UP1. En general, se considera que D1 está involucrado en la unión con IL-7, mientras que D2 está involucrado en la unión a la cadena γ c (y también con la IL-7). Cabe destacar que el sitio 2b del dominio D2 comprende tres láminas beta que incluyen las siguientes secuencias SEQ ID NO: 32 (FDLSVIYRE); SEQ ID NO: 33 (NDFVVTFTNTS) y SEQ ID NO: 34 (TKLTLLQR). Por lo tanto, el sitio 2b del dominio D2 está incluido entre los aminoácidos 109 y 180 de la SEQ ID NO: 22 (véase Walsh, 2012; Verstraete, K. *et al.*, Nature Com. 2017). También se puede definir el sitio 2b del dominio D2 como incluido entre los aminoácidos 109 y 173 de la SEQ ID NO: 22. También se puede definir el sitio 2b del dominio D2 como incluido entre los aminoácidos 113 y 180 de la SEQ ID NO: 22. También se puede definir el sitio 2b del dominio 2b como incluido entre los aminoácidos 113 y 173 de la SEQ ID NO: 22. En particular, el sitio 2b del dominio D2 comprende esencialmente los aminoácidos 109 a 133 de la SEQ ID NO: 22 y, en especial, 109 a 127, donde están localizadas las dos primeras láminas beta; y los aminoácidos 166 a 180 de la SEQ ID NO: 22, donde se localiza la tercera lámina beta. Más particularmente, el sitio 2b consiste esencialmente en los aminoácidos 113 a 133, en particular, 113 a 127, de la SEQ ID NO: 22 y en los aminoácidos 166 a 180 de la SEQ ID NO: 22. Más particularmente, el sitio 2b consiste esencialmente en los aminoácidos 109 a 133, en particular, 109 a 127, de la SEQ ID NO: 22 y en los aminoácidos 166 a 173 de la SEQ ID NO: 22. Más particularmente, el sitio 2b consiste esencialmente en los aminoácidos 113 a 133, en particular, 113 a 127, de la SEQ ID NO: 22 y en los aminoácidos 166 a 173 de la SEQ ID NO: 22. El sitio 2b del dominio D2 es crítico para la interacción CD127- γ c, en particular para permitir o aumentar la unión de CD127 con γ c en presencia de IL-7. En particular, se cree que las mutaciones en P112 y L115, que han sido identificadas en los pacientes que padecen una inmunodeficiencia combinada grave (SCID, *por sus siglas en inglés*), desestabilizan el núcleo hidrófobo del dominio D2 que probablemente genera sus características patógenas. Como se dijo anteriormente, el sitio 2b consiste esencialmente en los aminoácidos 109 a 180 de la SEQ ID NO: 22, o consiste

esencialmente en los aminoácidos 109 a 173 de la SEQ ID NO: 22, o consiste esencialmente en los aminoácidos 113 a 180 de la SEQ ID NO: 22, o consiste esencialmente en los aminoácidos 113 a 173 de la SEQ ID NO: 22. El experto en la técnica podrá apreciar que los extremos de tal dominio pueden no necesariamente definirse de manera inequívoca con una precisión de base única y que puede entenderse que el sitio 2b comprende, en uno o ambos extremos de las secuencias mencionadas, 1, 2, 3 o más o menos aminoácidos. Por lo tanto, cuando se hace referencia en la presente al sitio 2b de CD127, debe entenderse que se hace referencia a una secuencia de CD127 que comienza en la posición 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 o 113 y termina en la posición 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179 o 180 de la SEQ ID NO: 22; en particular, a una secuencia que se cree o se muestra como que constituye un sitio de unión esencial con la cadena γ c del IL7-R, en particular, en presencia de IL-7. Más particularmente, cuando en la presente se hace referencia al sitio 2b de CD127, debe entenderse que se alude a una secuencia de CD127 que comienza en la posición 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 o 113 y termina en la posición 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 o 133 de la SEQ ID NO: 22, pero también a una secuencia de CD127 que comienza en la posición 162, 163, 164, 165 o 166 y termina en la posición 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179 o 180 de la SEQ ID NO: 22. Cabe señalar que las tres láminas beta como se definen en la presente pueden comprender secuencias de epítipo específicas para anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o miméticos de unión a antígeno de acuerdo con la invención. Los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y miméticos de unión a antígeno de acuerdo con la invención pueden tener la capacidad de unirse específicamente a la SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33 y/o la SEQ ID NO: 34. Además, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una porción de una lámina beta y algunos aminoácidos contiguos localizados en un extremo de cualquier lámina beta también pueden ser una secuencia de epítopes específica para un anticuerpo de acuerdo con la invención. Como ejemplo, la secuencia de la SEQ ID NO: 35 (TLLQRKLQPAAMYEI) comprende los últimos cinco aminoácidos de la tercera lámina beta y diez aminoácidos extras ubicados fuera de la tercera lámina beta. Como otro ejemplo, la SEQ ID NO: 96 (RKLQPAAM) comprende un aminoácido ubicado dentro de la tercera lámina beta y siete aminoácidos extras ubicados fuera de la tercera lámina beta. En particular, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno o un mimético de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede unirse específicamente a R173 de la SEQ ID NO: 22. En particular, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede unirse específicamente a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 96. En

particular, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede unirse específicamente a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 36 (LVEVKCLNFR); SEQ ID NO: 37 (ICGALVEVKCLNFR) y SEQ ID NO: 38 (LVEVKCLNFRK). De manera alternativa o complementaria, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede unirse específicamente a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 39 (KKFLLIG); SEQ ID NO: 40 (KKFLLIGKSNI) y SEQ ID NO: 41 (FIETKKFLLIG). Las SEQ ID NO: 36 a SEQ ID NO: 41 están ubicadas dentro del dominio D1 de CD127 y son secuencias de epítopes reconocidas por un anticuerpo, fragmento del mismo de unión a antígeno o una molécula mimética de anticuerpo de acuerdo con la invención. En una forma de realización alternativa o complementaria de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno o una molécula mimética del anticuerpo de acuerdo con la invención puede unirse específicamente a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 42 (CLNFR) y SEQ ID NO: 43 (FIETKKF). Estas dos secuencias son secuencias de epítopes que se ubican dentro del dominio D1 de CD127. En una forma de realización en particular de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede unirse específicamente a al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 96, en particular del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 96; y al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43, en particular del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede unirse específicamente a la SEQ ID NO: 34 y al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43, en particular a las SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede unirse específicamente a la SEQ ID NO: 35; y al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43; en particular la SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede unirse específicamente a la SEQ ID NO: 96; y al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43, en particular a la SEQ ID NO: 42 y SEQ

ID NO: 43. En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede unirse a ambas secuencias, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 96. En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede unirse a ambas secuencias, SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. En una forma de realización en particular de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede reconocer específicamente al menos la tercera lámina beta del sitio 2b del dominio D2 de CD127. Con preferencia, la tercera lámina beta se define como ubicada entre los aminoácidos 166 y 173 de la SEQ ID NO: 22, correspondiente a la SEQ ID NO: 34, y más particularmente la tercera lámina beta corresponde a la SEQ ID NO: 34. En una forma de realización más particular de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede reconocer específicamente al menos dos de las láminas beta ubicadas dentro del sitio 2b del dominio D2 y, más particularmente, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno de acuerdo con la invención puede reconocer específicamente las tres láminas beta ubicadas dentro del sitio 2b del dominio D2, tal como se definió previamente en esta descripción. En una forma de realización más particular de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede reconocer específicamente al menos una lámina beta ubicada dentro del sitio 2b del dominio D2, en particular la tercera lámina beta correspondiente a la SEQ ID NO: 34 y se une al menos a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede reconocer específicamente al menos la tercera lámina beta correspondiente a la SEQ ID NO: 34; y al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43; en particular la SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. En una forma de realización más particular de la invención, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede reconocer específicamente un péptido lineal que consiste en los aminoácidos de la SEQ ID NO: 35. Como alternativa o de manera complementaria, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede reconocer específicamente un péptido conformacional o un epítipo conformacional que consiste en los aminoácidos de la SEQ ID NO: 96. En una forma de realización más particular, el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o mimético de unión a antígeno puede reconocer específicamente un epítipo lineal o un péptido lineal de la secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, y un epítoto conformacional o un péptido conformacional de la SEQ ID NO: 96.

[17] Señalización del IL-7R. La unión de la IL-7 al IL-7R desencadena la activación de varias vías de señalización, incluyendo las quinasas Janus (JAK)-1 y -3, transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5, *por sus siglas en inglés*) y fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-k). Se ha informado que las vías STAT1 y STAT3 han sido activadas, aunque estas no parecen ser las vías principales. La activación de la vía STAT5 es necesaria para la inducción de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y la prevención de la entrada de la proteína pro-apoptótica BAX en la mitocondria y, por lo tanto, para la supervivencia de los precursores tímicos de células T en desarrollo. La activación de la vía PI3-k da como resultado la fosforilación y retención citoplasmática de la proteína pro-apoptótica Bad.

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

[19] Las vías de señalización inducida por TSLP han demostrado ser diferentes, en el nivel molecular, de las vías inducidas por IL-7. En particular, mientras que la unión de TSLP a su receptor también activa Jak-1, no activa Jak-3, pero sí activa Jak-2. Estas diferencias son consistentes con la observación de que Jak-1 se asocia con CD127, compartida por ambos receptores, mientras que Jak-2 se asocia con CRLF2 y Jak-3 con γc (Rochman *et al.*, 2010). La activación de la vía de STAT5 también está informada respecto de la señalización inducida por TSLP (Zhong *et al.*, 2014). Uno de los principales efectos de TSLP es conducir a la activación de las células dendríticas, lo cual induce la sobreexpresión de moléculas co-estimuladoras como la CD80, de manera que se promueven respuestas inflamatorias mediadas por TH-2 (Reche *et al.*, 2001).

Biología celular

[20] “Células CD127 positivas” designa células que expresan CD127 en su superficie celular. En la mayoría de los casos, las células CD127 positivas expresan CD127 en un complejo que forma el IL-7R (células IL-7R positivas) o en un complejo que forma el TSLPR (células TSLPR positivas). CD127 es expresado por diversas células, incluyendo tanto las

células T de memoria como células T vírgenes. En particular, CD127 es expresado por células T efectoras (Teff), incluidas las células T en reposo y de memoria, y por células B inmaduras, pero especialmente no es expresada por las células T reguladoras naturales en reposo (Treg naturales). CD127 es esencial para promover la diferenciación de los timocitos y la expansión clonal de linfocitos.

[21] La importancia de la vía de IL7-CD127 para la homeostasis de células T vírgenes está subrayada por varios estudios recientes que muestran que los niveles de expresión de CD127 unido a la membrana sobre células T CD4+ convencionales se correlacionan con frecuencias de células T CD4+ tímicas recientes emigrantes (RTE, *por sus siglas en inglés*) en individuos sanos y en pacientes infectados por el VIH, así como en pacientes con EM (Albuquerque *et al.*, 2007) (Broux *et al.*, 2010). CD127 también es un componente del receptor de TSLP. Se ha demostrado que la secreción de TSLP por corpúsculos de Hassall, estructuras compuestas de células epiteliales en la médula tímica, condiciona las células dendríticas mieloides CD11c+ (MDC, *por sus siglas en inglés*) para inducir la diferenciación de los timocitos hacia Treg (Watanabe *et al.*, 2005a). Por consiguiente, las señales del receptor IL-7 son necesarias para el desarrollo de Treg, tal como se muestra en ratones knockout con CD127 (Mazzucchelli *et al.*, 2008). En Haas *et al.*, 2011, los autores mostraron una reducción de la expresión de CD127 en células T convencionales y los niveles plasmáticos de IL-7 regulados positivamente junto con reducción de las frecuencias de Treg tímicas recientes emigrantes y la función de Treg en la EM, sin una clara influencia genética (Haas *et al.*, 2011).

[22] El análisis minucioso de cómo IL-7 regula el tráfico membranal de su receptor cognato es crucial para comprender en profundidad el rol de IL-7/IL-7R en la función de los linfocitos. Algunos estudios previos han sugerido que la estimulación por IL-7 de células T conduce a la modulación superficial negativa de CD127 dentro de los 30 minutos, posiblemente a causa de la internalización del receptor. En posteriores puntos de tiempo (2-6 horas), se demostró que la IL-7 induce la regulación transcripcional negativa de CD127. Sin embargo, la propia dinámica de la internalización de CD127 y la regulación de los mecanismos de tráfico mediante IL-7 aún no han sido aclarados (Henriques *et al.*, 2010). También se sugirió que la señalización inducida por IL-7 depende de la internalización de CD127 y que la posterior degradación del receptor depende de la actividad de Jak-3 y es mediada por los proteasomas y lisosomas.

Fisiopatología

[23] Las células dendríticas expresan altos niveles de moléculas co-estimuladoras después de la maduración, tal como CD80, que promueve las respuestas inmunes mediadas por células T.

También producen la citoquina TARC (CCL17), que induce la quimiotaxis en células T. Como tales, las células dendríticas maduras contribuyen a la fisiopatología de varias enfermedades mediadas por el sistema inmune, donde están en juego las respuestas de las células T, como por ejemplo en el asma, la artritis reumatoide, colitis, esclerosis múltiple y uveítis. Las células dendríticas maduras también desempeñan un papel clave en el proceso de rechazo de aloinjertos de células, tejidos u órganos. Por lo tanto, muchas estrategias terapéuticas apuntan a evitar la maduración de las células dendríticas.

[24] La presencia o ausencia de moléculas co-estimuladoras sobre células presentadoras de antígenos (APC, *por sus siglas en inglés*), tales como las células dendríticas, influye significativamente sobre la naturaleza cualitativa y cuantitativa de una respuesta inmune. La sobreexpresión de CD80 por las células dendríticas causa la maduración de las DC y aumenta la activación de las células T de memoria (Bour-Jordan *et al.*, 2011). Mecánicamente, la interacción de CD28 con CD80 ocupa el clúster central de la sinapsis inmunológica y se ubica con el TCR acoplado, de modo que se estabiliza la sinapsis inmunológica (Dustin y Shaw, 1999) (Grakoui *et al.*, 1999). La interacción entre CD28 y CD80 realmente genera el espaciamiento apropiado para que TCR interactúe eficientemente con las moléculas HLA (Shaw y Dustin, 1997).

[25] La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante inflamatoria del sistema nervioso central (SNC). La aparición de parches desmielinizantes en el sistema nervioso central de los pacientes con EM se asocia con un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente de macrófagos y linfocitos T. En un nivel mecanicista, la EM se considera como una enfermedad autoinmune. Normalmente, la EM se considera una enfermedad principalmente mediada por células T CD4+. Ciertos subconjuntos de CD4+: Th1 y más recientemente Th17, estaban implicados en la fisiopatología de la enfermedad. En la actualidad, todavía es difícil asignar roles específicos para cada subpoblación de Th1 y Th17. Además, la inhibición del tráfico de leucocitos por el antagonismo de la alfa4-integrina ($\alpha 4$) ha sido validada como un enfoque terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como EM y enfermedad inflamatoria intestinal (EII), así como para el tratamiento de la aterosclerosis (Zhi *et al.*, 2014). $\alpha 4\beta 7$ es expresado en un conjunto más restringido de leucocitos que incluyen macrófagos activados, subconjuntos de linfocitos, células NK, mastocitos y eosinófilos.

[26] La IL-7 humana induce la fuerte expresión de integrinas $\alpha 4$ y $\beta 7$ *in vitro* en linfocitos T humanos y aumenta considerablemente la frecuencia de los linfocitos T humanos que expresan las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4\beta 7$, que son necesarias para el alojamiento y retención de los linfocitos

T en tejidos no linfoides, tales como el intestino, el cerebro y la piel (Denucci *et al.*, 2009; Gorfú *et al.*, 2009).

[27] Las células T vírgenes son parcialmente responsables del rechazo agudo de órganos y tejidos trasplantados. Estas células pueden ser controladas por los actuales medicamentos inmunosupresores (inhibidores de la calcineurina) y por anticuerpos monoclonales que bloquean la co-estimulación (anti-adherencia, inhibidores de CD80/86). Las células T de memoria también son responsables del rechazo trasplantes. Las células T de memoria se acumulan en el hombre debido a la historia inmune adquirida, principalmente reacciones previas contra los virus. Se ha demostrado que las células T de memoria pueden ser reactivadas por aloantígenos como resultado de “inmunidad heteróloga”, que es la reacción cruzada de nuestras defensas antivirales con aloantígenos (Adams *et al.*, 2003). La inmunidad heteróloga representa una poderosa barrera para la inducción de tolerancia, dado que las células T de memoria, en contraste con las células T vírgenes, están programadas para activarse rápidamente, con un menor requerimiento de señales co-estimuladoras. Las células T de memoria también pueden estar implicadas en el rechazo crónico. Además de su papel en el trasplante de órganos y tejidos, las células T vírgenes y de memoria también son corresponsables de muchas enfermedades autoinmunes. Este es el caso de la colitis ulcerativa (Shinohara *et al.*, 2011), artritis reumatoide, psoriasis o enfermedad de injerto versus hospedador.

[28] Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), tales como la colitis ulcerativa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), son trastornos gastrointestinales recurrentes crónicos caracterizados por inflamación intestinal crónica, respuestas inmunes desreguladas a la microbiota intestinal y la disfunción de la barrera epitelial (Khor *et al.*, 2011; Abraham y Cho, 2009). Las tasas de incidencia y prevalencia de EII están aumentando en todo el mundo, estas enfermedades están asociadas con una marcada morbilidad y tienen un gran impacto en la calidad de vida y capacidad de trabajo (Danese y Fiocchi, 2011; Baumgart y Sandbom, 2012). Los tratamientos convencionales actuales apuntan a atenuar la inflamación con el uso gradual de los agentes antiinflamatorios, drogas inmunosupresoras y agentes biológicos dirigidos a citoquinas inflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , *por sus siglas en inglés*). Una característica clave de las EII también es el reclutamiento rápido y la persistencia prolongada de leucocitos en el sitio de la inflamación, lo cual es permitido por la interacción de las integrinas con los receptores cognatos que se expresan por las células endoteliales, de modo que se permite la adhesión y la trans migración celulares (Adams y Eksteen, 2006; Agace, 2006). Los nuevos tratamientos están dirigidos a esta puerta de entrada al intestino con moléculas anti-adherencia, dirigidas especialmente a la vía de las integrinas $\alpha 4\beta 7$ específicas del intestino

(Feagan *et al.*, 2013; Sandbom *et al.*, 2013). Sin embargo, estos tratamientos no mantienen la remisión en más de la mitad de los pacientes, lo cual produce recidivas en una alta proporción de respondedores primarios. Las infecciones oportunistas también se desarrollan como consecuencia de la inmunosupresión general. Así, uno de los principales objetivos es proporcionar novedosos tratamientos para las EII e identificar marcadores que determinan la cronicidad, la respuesta y la recidiva de las EII.

[29] Además, se ha demostrado que varias células malignas exhiben IL-7R. Este es el caso del linfoma cutáneo de Sezary (60% de ellos), o la leucemia linfoblástica aguda infantil donde alrededor del 15% de los casos desarrollan mutaciones de ganancia de función en CD127, lo cual hace que estos tumores dependan parcialmente de IL-7 (Shochat *et al.*, 2011).

[30] La depleción de linfocitos T ha sido un claro enfoque inmunosupresor para contrarrestar el rechazo del aloinjerto o luchar contra la autoinmunidad. Sin embargo, el agotamiento total de células T puede no ser favorable para la inducción de tolerancia inmunológica. Hacer diana en subpoblaciones de células T o células T activadas de forma selectiva, sin modificar las células Treg, podría constituir un enfoque protolerogénico (Haudebourg *et al.*, 2009). Así, CD127 puede ser considerado como una potencial diana terapéutica atractiva para los anticuerpos monoclonales (mAb, *por sus siglas en inglés*) destinada a modular las respuestas inmunes, dado que dichos anticuerpos monoclonales podrían tener el potencial de agotar linfocitos efectores pero no linfocitos reguladores. En consecuencia, se ha asumido que podrían demostrar eficacia en trasplantes, autoinmunidad (Michel *et al.*, 2008) y neoplasias malignas al antagonizar el acceso de IL-7 a IL-7-R, y limitar así la función y el crecimiento de las células T y B.

[31] Un tratamiento con un anticuerpo monoclonal contra células CD127+ que interfiere con la vía de IL-7 podría cumplir ese objetivo eliminando/neutralizando las células de T vírgenes y de memoria, y/o reduciendo su número mientras que se preservan las células Treg, o eliminando o reduciendo el número de células malignas CD127 positivas. Sin embargo, un tratamiento con anticuerpos monoclonales contra células CD127+ podría actuar como una espada de doble filo si conduce a la activación de las células dendríticas. De hecho, CD127 también es expresado por las células dendríticas en asociación con CRLF2, de manera que se forma el receptor de TSLP. En presencia de TSLP, las células dendríticas se activan y promuevan respuestas inmunitarias mediadas por células T. Algunos anticuerpos monoclonales contra CD127, presumiblemente modificando la manera en que la TSLP interactúa con el receptor de TSLP, tienen la propiedad de aumentar la maduración de las células dendríticas inducidas por TSLP. Como consecuencia, un tratamiento con anticuerpo monoclonal contra CD127 que no aumente la maduración de las células dendríticas inducida por TSLP presentaría una ventaja terapéutica.

Acarrearía el beneficio del bloqueo de IL7-R sin el inconveniente de la activación de las células dendríticas en un entorno inflamado que contenga TSLP.

[32] En una publicación (Racapé *et al.*, 2009) los autores analizaron el interés del receptor alfa de IL-7 (IL7-R α) como un potencial objetivo terapéutico en los casos de trasplantes. Habiendo examinado la expresión de IL-7R α en diversas células T y células sensibles a IL-7, los autores determinaron si hacer diana en células T de memoria que expresan IL-7R α podría prolongar la supervivencia del aloinjerto en ratones y concluyeron que hacer diana en IL-7 o IL-7R α ventajosamente ahorraría células Treg. Entre las perspectivas, los autores señalaron que la diana en IL-7 o IL-7R α en el tratamiento terapéutico podría tener diferentes consecuencias sobre la supervivencia de las células que expresan CD127 y podría desencadenar diferentes tipos de linfopenia. La cuestión de los efectos de los anticuerpos que estarían dirigidos contra IL-7R α dependiendo de si pudieran estar bloqueando o neutralizando o los anticuerpos citotóxicos también fue planteada desde un punto de vista conceptual. Sin embargo, los autores no demuestran haber obtenido y sometido a prueba estos anticuerpos y expresaron la necesidad de realizar más estudios para evaluar la pertinencia de las hipótesis.

[33] En vista de los inconvenientes de los enfoques terapéuticos disponibles respecto de enfermedades inmunes y otras enfermedades que involucran IL-7/IL-7R α , tales como diferentes tipos de cánceres, incluidos algunos cánceres de mama, todavía existe una necesidad de contar con nuevos fármacos candidatos, especialmente para los candidatos activos en lo que respecta a dianas más selectivas con el propósito de controlar, por ejemplo modular la activación inmune en pacientes humanos.

[34] En este contexto, los anticuerpos monoclonales contra IL-7R α que tienen propiedades antagonistas hacia IL-7R α han sido divulgados en la WO 2010/017468 y sus versiones humanizadas en la WO 2011/094259 con miras a tratar enfermedades autoinmunes, tal como la esclerosis múltiple. Se dice que los anticuerpos descriptos son antagonistas para la unión de IL-7 a su receptor y activos contra la expansión y supervivencia de las células T_H17 y T_H1 que se dice requieren la interacción de IL-7 con su receptor CD127. El efecto de estos anticuerpos sobre la maduración de las células del sistema inmune, y en particular de las células dendríticas, no ha sido considerado. Además, se sostiene que estos anticuerpos no inhiben la producción de TARC inducida por TSLP (página 107 de la WO 2011/094259). Asimismo, los anticuerpos anti-CD127 informados en la WO 2011/104687 o WO 2013/056984, que están previstos para su uso en el tratamiento de diabetes, lupus, artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes, no han sido analizados con respecto a su posible efecto sobre la maduración de las células

dendríticas, y no se ha informado su interacción con la señalización inducida por TSLP. Además, como publicaron Kern *et al.* (Kern *et al.*, 2013; Kern *et al.*, 2015) y como se muestra aquí, los anticuerpos anti-CD127 de la técnica previa inducen la internalización del receptor. Dado que los anticuerpos antagonistas anti-CD127 que también inducen la internalización de CD127 fallan en controlar la hipersensibilidad cutánea tipo IV, mientras que los anticuerpos antagonistas anti-CD127 que no inducen la internalización sí lo hacen, es posible que el proceso de internalización active la vía de señalización, de modo que se mitigue el efecto antagonista de los anticuerpos. Por último, los anticuerpos de la técnica previa reconocen un epítipo que no comprende ninguna secuencia desde el sitio 2b de CD127 (es decir, en particular a partir de los aminoácidos 109-180 de la SEQ ID NO: 22, o en particular a partir de los aminoácidos 109-173 de la SEQ ID NO: 22, o en particular a partir de los aminoácidos 113-180 de la SEQ ID NO: 22, o en particular a partir de los aminoácidos 113-173 de la SEQ ID NO: 22); y no se ha demostrado que perturben la unión de CD127 con la cadena γ c de IL7-R.

[35] A pesar del reciente interés en el desarrollo de anticuerpos CD127, los esfuerzos se han concentrado en la inhibición de la señalización de IL-7R inducida por IL7. No obstante, TSLP y TSLPR han participado en un gran número de patologías. Se ha demostrado que TSLP desempeña un papel en enfermedades de la piel y pulmonares, (He y Geha, 2010) y que se asocia a diversas patologías, tales como enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias y dermatitis atópica en humanos y ratones (Ying *et al.*, 2008) (Jariwala *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que TSLP se asocia a la regulación de la inmunidad y la inflamación de los intestinos (Taylor *et al.*, 2009). Otras patologías en las que se ven involucrados TSLP y TSLPR incluyen leucemia pediátrica de células B (van Bodegom *et al.*, 2012), trastornos alérgicos específicos de la piel y los pulmones, enfermedades relacionadas con la autoinmunidad (Roan *et al.*, 2012) y cáncer, incluso cáncer de mama (Olkhanud *et al.*, 2011).

[36] Los anticuerpos que no muestran el efecto de aumentar la maduración de las células dendríticas y/o que no inducen la internalización de CD127 y/o que inhiben la internalización inducida por IL7 se divulgaron en la WO 2015/189302. Dichos anticuerpos, denominados N13B2 (anticuerpo quimérico), N13B2-h1, N13B2-h2 y N13B2-h3 (N13B2 humanizados) en dicha solicitud y en la presente en adelante, tienen una alta eficiencia, especialmente *in vivo* y en particular mostraron tener un rápido efecto sobre las células T efectoras de memoria, tal como se definen de aquí en adelante. Sin embargo, dichos anticuerpos son humanizados en una medida limitada y su eficiencia de producción también es limitada. Además, no se informó ningún efecto duradero de dichos anticuerpos en las células T efectoras de memoria.

[37] La invención se refiere a herramientas para el diseño de nuevos anticuerpos adecuados como candidatos terapéuticos para la administración a pacientes en riesgo de padecer una enfermedad que involucre las vías de señalización de la IL-7. Según diversos enfoques que se proporcionan en la presente, estas herramientas mejoran la preparación de los anticuerpos destinados a la administración en hospedadores humanos. Estas herramientas comprenden, en particular, anticuerpos humanizados, especialmente monoclonales, que comprenden todas las secuencias de las CDR de N13B2-h3.

[38] Tales polipéptidos (o polinucleótidos que codifican tales polipéptidos) son provistos en particular para la producción de anticuerpos (o fragmentos de los mismos de unión a antígeno) y/o como anticuerpos (o fragmentos de los mismos de unión a antígeno), en particular los que se unen específicamente a CD127; comprendiendo dichos anticuerpos, en especial anticuerpos monoclonales, un dominio variable de la cadena pesada que comprenden las tres secuencias de las CDR: VHCDR1 establecida en la SEQ ID NO: 1; VHCDR2 establecida en la SEQ ID NO: 2 y VHCDR3 establecida en la SEQ ID NO: 3. En particular, dicho dominio variable de la cadena pesada consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7 o tiene dicha secuencia con mutaciones adicionales, en particular, sustitución, delección o inserción de cuatro residuos, preferiblemente tres o dos residuos e incluso más preferentemente un residuo, preferiblemente donde dichas mutaciones no están en las secuencias de la CDR ni en posiciones canónicas o Vernier de las secuencias marco.

[39] Preferiblemente, los anticuerpos que se proporcionan en la presente son anticuerpos monoclonales, en el sentido de que una composición de estos anticuerpos es homogénea, especialmente idéntica, en términos de especificidad de unión a antígeno y, en consecuencia, en términos de la composición de la región variable.

[40] La invención proporciona anticuerpos que comparten las CDR del anticuerpo N13B2-h3, pero que tienen un marco de dominio variable de la cadena liviana distinto. Sorprendentemente, los inventores han demostrado que los anticuerpos que comprenden las mismas CDR del dominio variable de la cadena liviana de N13B2-h3, es decir, las CDR con SEQ ID NO: 4 y 5 y 6, pero que comprenden una secuencia del dominio variable de la cadena liviana diferente, es decir, de la SEQ ID NO: 9; de la SEQ ID NO: 10; de la SEQ ID NO: 11 o de la SEQ ID NO: 12; si bien son extensamente humanizados, se producen altamente en comparación con N13B2-h3 (hasta 4 veces mayor), a la vez que se conservan todas las características funcionales.

[41] La invención proporciona un medio adecuado en este contexto, que comprende en particular, anticuerpos monoclonales específicos contra el IL-7R α . En formas de realización particulares, dichos anticuerpos interfieren solo negativamente con la vía de TSLP. Por consiguiente, en formas de realización preferidas dichos anticuerpos no aumentan la maduración de células dendríticas inducida por TSLP. Como alternativa o de manera adicional, en formas de realización particulares, dichos anticuerpos no inducen la internalización de CD127 y/o inhiben la internalización inducida por IL7 de CD127. En formas de realización particulares, dichos anticuerpos combinan estas propiedades relacionadas con la maduración y/o la internalización de células dendríticas con actividad antagonista hacia la señalización de IL-7/IL-7-R. En formas de realización particulares, dichos anticuerpos inhiben la expresión inducida por IL7 de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ en las células T, especialmente *in vivo*. En formas de realización particulares, dichos anticuerpos ejercen una acción citotóxica contra las células diana CD127+ que reducen físicamente su número (contracción de la subpoblación). De manera adicional o alternativa, en formas de realización específicas, dichos anticuerpos comprenden al menos 80%, preferiblemente al menos 84% o más del 84%, e incluso más preferentemente al menos 85% de residuos humanos, tal como se definen en adelante. De manera adicional o alternativa, en formas de realización específicas, dichos anticuerpos son producidos al menos con la misma eficiencia que N13B2-h3, preferentemente al menos con el doble de eficiencia, tal como se define en adelante. De manera adicional o alternativa, en formas de realización específicas, dichos anticuerpos tienen un efecto rápido y/o de larga duración sobre las células T efectoras de memoria.

[42] En particular, los anticuerpos provistos en la presente comprenden una cadena pesada variable (VH) que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:

VHCDR1 SEQ ID NO: 1;

VHCDR2 SEQ ID NO: 2;

VHCDR3 SEQ ID NO: 3.

Preferiblemente, los anticuerpos provistos en la presente comprenden una cadena VH que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7:

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAVSGFTLSDYIMAWIRQAPGKGLEWVSTISASGLRT
YYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPLSAHYGFNYFDYWGQG
TLVTVSS. Dicha cadena pesada variable está particularmente unida a la cadena pesada

constante que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 26 para constituir una cadena pesada de anticuerpo completa.

[43] En particular, los anticuerpos provistos en la presente comprenden una cadena VL que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; la secuencia de la SEQ ID NO: 11; y la secuencia de la SEQ ID NO: 12; en particular la secuencia de la SEQ ID NO: 12:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSEDIYQGLAWYQQKPGKAPKLLLYSANTLHIGVP
SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQYYDYPLAFGGGTKVEIK. Dicha cadena liviana variable está particularmente unida a la cadena liviana constante que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28; en particular la SEQ ID NO: 27, para constituir una cadena liviana de anticuerpo completa.

En particular, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con la invención se une específicamente a CD127, en particular, a CD127 humano y comprende:

- una cadena liviana de anticuerpo que comprende, o un dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo que consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; en particular la SEQ ID NO: 12; y
- un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende las tres CDR que consisten en las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; en particular un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

En una forma de realización más particular de la invención, el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno se une específicamente a CD127, en particular, a CD127 humano y comprende:

- un dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo o una cadena liviana del anticuerpo de acuerdo con la invención, que particularmente consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12; en particular la SEQ ID NO: 12; y
- un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende las tres CDR que consisten en las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; en particular un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo

que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.

Unión del CD127

[44] De acuerdo con la invención, “unión” a la proteína IL-7R α se refiere a una interacción del tipo antígeno-anticuerpo y abarca propiedades de “unión específica” de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de unión a antígeno cuya unión específica significa que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se unen a la proteína IL-7R α mientras que no se unen o se unen con una afinidad significativamente más débil a otras proteínas (por ejemplo, la cadena γ del receptor de citoquina). La unión específica se define y/o determina preferiblemente en condiciones fisiológicas, especialmente en términos de pH y contenido de sal de la solución de ensayo. La unión y la especificidad de unión pueden ser ensayadas de acuerdo con los ensayos que se describen en los Ejemplos y en particular, pueden someterse a ensayos mediante análisis por biosensor, Blitz, Biacore, ELISA o Western Blot.

[45] En formas de realización particulares, los anticuerpos proporcionados en la presente se dirigen y se unen a la cadena IL-7-R alfa cuando forma un complejo en el receptor TSLP (con CCRF2; número de acceso GenBank AF338733; Reche *et al.*, 2001). En formas de realización particulares, los anticuerpos provistos en la presente se unen a CD127 como una proteína aislada con una constante de afinidad (K_D) igual o inferior a $5E-9$ M, como puede determinarse mediante análisis por biosensor, en particular, por el método de Blitz. En formas de realización particulares, las propiedades de unión de los anticuerpos son determinadas o definidas utilizando un antígeno de CD127 humano que comprende las secuencias de ep1 (SEQ ID NO: 19) y/o ep2 (SEQ ID NO: 20). En formas de realización particulares, el antígeno comprende un fragmento de CD127 humano que comprende tanto ep1 como ep2 (es decir, el antígeno comprende las secuencias de ep1 y ep2 y las secuencias intercaladas de CD127 humano). En formas de realización particulares, los anticuerpos provistos en la presente tienen al menos la misma afinidad a dicho antígeno que el anticuerpo N13B2-h3 que se da a conocer en la WO 2015/189302, y/o que el anticuerpo N13B2-hVL6 que se describe en la presente (donde la VH tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 7, y la VL tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 12) y/o que el anticuerpo con la VH que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 7, y la VL con la secuencia de la SEQ ID NO: 10 o con la secuencia de la SEQ ID NO: 11.

[46] El experto en la técnica conoce los métodos de ensayo para la unión de los anticuerpos a su diana, ya sea CD127 de longitud completa, aislado o como el TSLPR o IL7-R, o un antígeno de los mismos, como se indicó, que comprende en particular el método de Blitz, y se ilustran en particular en la Figura 3, en el Ejemplo 3 y en el Ejemplo 4 de la presente, como así también en

la página 14, las figuras 3, 4 y 6 y las respectivas leyendas y los ejemplos 1, 2, 6, 7 de la WO 2015/189302.

Ausencia de aumento de la maduración de células dendríticas inducida por TSLP

[47] Los anticuerpos provistos en la presente pueden unirse a CD127 en el receptor de TSLP (es decir, se pueden unir a CD127 cuando se encuentra en un complejo con CRLF2, que forma el receptor de TSLP). Por lo tanto, los anticuerpos que se proporcionan en la presente pueden interferir con la señalización inducida por TSLP y/o mediada por el receptor de TSLP. Preferiblemente, los anticuerpos proporcionados en la presente no presentan sinergia con TSLP para la maduración de las células inmunes, en particular las células dendríticas. En otras palabras, los anticuerpos de la invención no aumentan la maduración de las células del sistema inmune inducida por TSLP.

[48] Este efecto es particularmente deseado en la maduración de las células dendríticas. Los medios para medir ese efecto son conocidos por el experto en la técnica y se divulgan en particular en las páginas 16-17 de la WO 2015/189302 y en el ejemplo 9 de esa solicitud. En particular, los anticuerpos proporcionados en la presente no aumentan la expresión de CD40 en más del 50% en comparación con la estimulación con TSLP solamente (sin anticuerpo). Preferentemente, la expresión de CD40 no es aumentada en más del 25%, preferiblemente no más del 10% e incluso más preferiblemente no más de 5%. En formas de realización particularmente preferidas, la expresión de CD40 no es incrementada o es disminuida en las células estimuladas con TSLP y con dichos anticuerpos en comparación con las células estimuladas solamente con TSLP.

Inhibición de la expresión inducida por IL7 de integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$

[49] En formas de realización particulares, los anticuerpos proporcionados en la presente inhiben la expresión inducida por IL7 de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ *in vivo*. La expresión inducida por IL7 de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$, tal como se utiliza aquí, designa uno o ambos de: el aumento en el nivel de expresión de las integrinas $\alpha 4$ y $\beta 7$ y el aumento en el número o relación de linfocitos T que expresan las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$. La inhibición puede ser parcial, es decir, el nivel de expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ en presencia de IL7 está aumentado respecto del nivel de línea de base (es decir, el nivel sin anticuerpos ni IL7) en presencia de anticuerpos, pero menos que en ausencia de anticuerpos; o la inhibición puede ser completa, es decir, el nivel de expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y $\alpha 4/\beta 7$ en presencia de IL-7 y del anticuerpo no es mayor que el nivel de línea de base.

[50] En formas de realización particulares, los anticuerpos provistos en la presente inhiben la expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$ *in vitro*, es decir, el nivel de expresión de las integrinas $\alpha 4$, $\beta 7$ y/o $\alpha 4/\beta 7$ es menor en las células tratadas con anticuerpos (con y/o sin IL7) que en las células no tratadas (es decir, sin anticuerpo ni IL7). La medida de la inhibición puede ser dependiente de la dosis. La inhibición de la expresión puede ser más específicamente definida, ensayada y/o medida como se expone en la página 18 del documento WO 2015/189302, en particular en el párrafo [58], y en el ejemplo 16.

Inhibidores de la internalización de CD127

[51] En una forma de realización particular, los anticuerpos provistos en la presente inhiben la internalización inducida por IL7 de CD127. Por lo tanto, cuando se incuban con dichos anticuerpos, la presencia de IL7 no induce ninguna disminución en la expresión de CD127 en la superficie celular, o induce una disminución menos fuerte en la expresión de CD127 en la superficie celular que las células incubadas sin anticuerpos. En formas de realización particulares, cuando se incuban con dichos anticuerpos, el nivel de expresión de CD127 en la superficie celular cuando se incuban las células a 37°C durante 15 minutos con 5 ng/ml de IL7 es de al menos 80%, preferiblemente al menos 90% del nivel de expresión en la superficie celular en las células incubadas sin IL7. *In vitro*, la expresión en la superficie celular se mide preferiblemente después de un tiempo limitado, como se indicó anteriormente. Además, como la mayoría de los procesos de internalización celular están inhibidos a baja temperatura, el efecto generalmente se observa mejor a temperatura fisiológica, en particular a 37°C. Sin embargo, también está previsto que se incuben las células a baja temperatura, en particular a 4°C.

[52] En una forma de realización preferida, los anticuerpos provistos en la presente no inducen la internalización de CD127. Así, la expresión de CD127 en la superficie celular en células incubadas en presencia de dichos anticuerpos no se reduce, o no se reduce significativamente, en relación a la expresión en la superficie celular en células incubadas en idénticas condiciones, pero en la ausencia del anticuerpo. En formas de realización particulares, cuando se incuban a 37°C durante 30 a 45 minutos en presencia de 50 ng/ml de anticuerpo, el nivel de expresión de CD127 en la superficie celular es al menos 80%, preferiblemente al menos 90% de su nivel en las células incubadas en ausencia del anticuerpo. Este efecto puede observarse en la ausencia de IL7 (tanto en células tratadas con anticuerpos como en células no tratadas), en presencia de IL7 y/o ambas situaciones.

[53] Las dos características de CD127 relacionadas con la internalización descritas anteriormente (es decir, la inhibición de la internalización inducida por IL-7 o la no inducción de la internalización) pueden definirse con más precisión y/o ensayarse de la manera que se enuncia en la WO 2015/189302, en particular en los párrafos [59]-[63] de las páginas 19-20, en la figura 16 y el ejemplo 5.

Interrupción de la interacción de CD127-cadena γ c

[54] De acuerdo con una forma de realización particular, los anticuerpos provistos en la presente pueden interrumpir la unión de CD127 a la cadena γ c de IL7-R. Esto significa que, en condiciones (en particular condiciones químicas y físicas) donde CD127 y la cadena γ c están unidas en ausencia de anticuerpo y en particular, en presencia de IL7, la presencia de dichos anticuerpos reduce significativamente dicha unión. En formas de realización particulares, en presencia de anticuerpo y de IL7, CD127 no se une a γ c. En particular, en presencia del anticuerpo y de IL7, la cantidad de cadena γ c encontrada asociada con (o unida a) CD127 es menor que 80%, preferiblemente menor que 50%, incluso más preferiblemente menor que 25% o 10% de la cantidad unida en ausencia del anticuerpo (o en presencia de otro anticuerpo anti-CD-127, tal como MD707-13) en condiciones por lo demás idénticas, en particular en presencia de IL7. Esta característica del anticuerpo puede evaluarse, en particular mediante métodos de coimmunoprecipitación, que son bien conocidos por el experto en la técnica para someter a ensayo la interacción de las proteínas y se ilustra, entre otros, en el ejemplo 21 de la WO 2015/189302. En particular, las células pueden ser incubadas en presencia o ausencia del anticuerpo ensayado, luego solubilizadas en condiciones que permiten la conservación de los complejos proteicos, y el lisado resultante puede ser sometido a una inmunoprecipitación de anti-CD127 y la presencia de γ c en el complejo inmunoprecipitado que contiene CD127 evaluado por Western Blot utilizando anticuerpos anti- γ c (inversamente, la inmunoprecipitación se puede realizar usando anticuerpos anti- γ c y la presencia de CD127 evaluada utilizando anticuerpos anti-CD127).

Antagonista hacia la interacción IL7-IL7-R

[55] De acuerdo con una forma de realización particular, una macromolécula, en particular un anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con la invención tiene, además, propiedades antagonistas hacia la interleuquina 7 (IL7), con lo cual se antagoniza el acceso, es decir, la unión de IL7 a CD127 sobre las células CD127 positivas.

[56] “Propiedades antagonistas hacia la interacción IL7-IL7-R” significa que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la invención, con diana en IL7-R alfa, tienen el efecto de impedir la accesibilidad del receptor de IL7 que se expresa en células CD127, especialmente células T efectoras humanas, en particular las células T de memoria humanas, para su ligando IL7, en particular la IL7 humana. Como resultado de antagonizar la unión de IL7, los anticuerpos de la invención o sus fragmentos funcionales conducen a linfopenia mediante la prevención de la generación de células T del timo dependientes de IL7.

[57] Las propiedades antagonistas pueden ser en particular, antagonismo hacia la señalización de IL7-R inducida por IL7. Un antagonista de la señalización de IL7-R inducida por IL7 se puede identificar mediante la medición de la inhibición de la fosforilación de STAT5, tal como se describe en los Ejemplos. La fosforilación de STAT5 inducida por IL7 es un marcador de la activación de IL7-R y se prevé que un anticuerpo antagonizante de la interacción IL7-IL7-R disminuya la fosforilación de STAT5 inducida por IL7.

[58] En formas de realización particulares, la macromolécula de la invención es un antagonista de la señalización de IL7-R inducida por IL7. En una forma de realización particular, la macromolécula de la invención inhibe la fosforilación de STAT5 inducida por IL7. En formas de realización preferidas, la inhibición de la fosforilación de STAT5 es mayor que 50% a concentraciones de anticuerpo tan bajas como 55 ng/ml y/o la inhibición de la fosforilación de STAT5 es mayor que 80% a concentraciones de anticuerpo tan bajas como 100 ng/ml. La inhibición de la fosforilación de STAT5 puede evaluarse por métodos conocidos para el experto en la técnica y, en particular, por el método expuesto en la sección de ejemplos, en particular en el Ejemplo 5, y/o en la página 21, párrafos [69] y [70] y en el ejemplo 3 de la WO 2015/189302.

[59] También es deseable que la macromolécula de la invención (en particular anticuerpo, fragmento del mismo de unión a antígeno o molécula mimética de anticuerpo) inhiba la activación y/o no active ni aumente la activación de las vías de señalización de PI3-k o ERK (quinasa regulada por señal extracelular) y en particular, inhiba la fosforilación y/o no induzca o aumente la fosforilación de PI3-k y/o ERK 1 y/o ERK 2. En particular, el anticuerpo, fragmento del mismo de unión a antígeno o la molécula mimética del anticuerpo que se proporciona en la presente y en particular, tal anticuerpo, fragmento del mismo de unión a antígeno o molécula mimética de anticuerpo que es un antagonista de la interacción IL-7-IL-7R, no induce la activación de las vías de PI3-k y/o ERK (preferiblemente de la vía de PI3-k y ERK), y en particular, no induce la fosforilación de la PI3-k y/o de ERK 1 o de ERK 2, concretamente no induce la fosforilación de la PI3-k, de ERK 1 y de ERK 2. En particular, el

anticuerpo, fragmento del mismo de unión a antígeno o la molécula mimética de anticuerpo provista en la presente y en particular, dicho anticuerpo, fragmento del mismo de unión a antígeno o molécula mimética de anticuerpo que es un antagonista hacia la interacción de IL-7-IL-7R, inhibe la activación de las vías PI3-k, ERK 1 y/o ERK 2, y en particular, inhibe la fosforilación de la PI3-k, ERK 1 y/o ERK 2, más concretamente inhibe la fosforilación de PI3-k, de ERK 1 y de ERK 2. La activación de las vías y/o la fosforilación de dichas proteínas puede analizarse por métodos que el experto en la técnica conoce y, en particular, por Western Blot como se muestra en la Figura 7 y en el Ejemplo 8.

Antagonista para la unión de TSLP

[60] Dado que los anticuerpos que se proporcionan en la presente se unen a CD127 en IL7-R, también se pueden unir a CD127 en TSLPR, y particularmente por impedimento estérico y/o por competencia en sitios de unión comunes, pueden inhibir la unión de la TSLP al TSLPR. En otras palabras, los anticuerpos que se proporcionan en la presente pueden presentar actividad antagonista para la unión de TSLP.

Inhibidor de la producción de TARC inducida por TSLP

[61] En una forma de realización particular, los anticuerpos que se proporcionan en la presente inhiben la producción de TARC inducida por TSLP de las células CD127 positivas. Como se mencionó anteriormente, las células dendríticas estimuladas por TSLP producen niveles elevados de TARC. Esto puede ser el resultado de su unión al TSLPR y su potencial de acción como antagonistas de la unión a TSLP. En una forma de realización específica, los anticuerpos que se proporcionan en la presente no aumentan la maduración de las células dendríticas (por ejemplo, la maduración determinó un incremento en la expresión de los marcadores de la superficie celular CD40 y/o CD80).

[62] El nivel de producción de TARC inducida por TSLP puede ser menor en las células tratadas con TSLP junto con los anticuerpos anti-CD127 que se proporcionan en la presente, que en las células tratadas solo con TSLP. En otras palabras, los anticuerpos que se proporcionan en la presente pueden ser inhibidores de la producción de TARC inducida por TSLP. En una forma de realización de la invención, los anticuerpos provistos en la presente disminuyen los niveles de producción de TARC. En una forma de realización particular, el nivel de producción de TARC en células tratadas con TSLP y un anticuerpo provisto en la presente se reduce en más del 10%, preferiblemente más de 20%, en comparación con el nivel en células tratadas solo con TSLP, a concentraciones de anticuerpo tan bajas como 1 µg/ml. La

medición de la producción de TARC puede llevarse a cabo en células inmunitarias CD127 positivas, en particular células dendríticas, a partir de una muestra de sangre, empleando cualquier método estándar que conozca el experto en la técnica y se ilustra, entre otros, en el ejemplo 9 de la WO 2015/189302.

Actividad citotóxica

[63] En una forma de realización en particular, los anticuerpos que se proporcionan en la presente son citotóxicos contra las células humanas, especialmente las células T humanas que expresan CD127. Las células humanas que expresan CD127 como una cadena del receptor de IL7, que son la diana de dichos anticuerpos, son principalmente linfocitos T, y más precisamente son las subpoblaciones de linfocitos T efectores incluyendo células T vírgenes y de memoria, pero no son las células T reguladoras (Treg), especialmente no son Treg naturales en reposo. Las células T de memoria son generadas como resultado del primer contacto con el antígeno y se definen principalmente por sus características funcionales, incluyendo la capacidad de experimentar proliferación por memoria cuando se produce la reactivación y diferenciación en células de memoria efectoras secundarias. Asimismo, el receptor TSLP diana (tal como un complejo que incluye la cadena IL-7-R alfa) regula la diferenciación de los linfocitos T helpers, las células B y las células dendríticas.

[64] En particular, los anticuerpos que se proporcionan en la presente, que tienen “actividad citotóxica contra las células T” o propiedades citotóxicas (anticuerpos citotóxicos) dan lugar al agotamiento de la población de células T efectoras al eliminar estas células y, en consecuencia, reducir el número de estas células cuando son administrados. Por el contrario, dichos anticuerpos no alteran la subpoblación de células T reguladoras o no la alteran en un grado significativo, lo cual permite que las células Treg realicen su función. En este contexto, en una forma de realización particular, la relación de células T reguladoras (Treg) respecto de las células T efectoras (Teff) crece después de la administración de dichos anticuerpos. En particular, los anticuerpos que se proporcionan en la presente permiten elevar dicha relación alrededor del 10% o más. En particular, el aumento en la relación de las Treg respecto de las Teff es de aproximadamente 20%.

[65] En particular, los anticuerpos citotóxicos exhiben citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, *por sus siglas en inglés*). Alternativamente, los anticuerpos que se proporcionan en la presente no tienen propiedades de ADCC. El potencial de ADCC de los anticuerpos puede considerarse positivo cuando la citotoxicidad específica es, por ejemplo, superior al 10%. Las propiedades de ADCC se pueden evaluar en un ensayo de ADCC, tal

como el ensayo descrito en el ejemplo 10 de la WO 2015/189302. Cuando el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo procedente de rata, las células efectoras utilizadas en el ensayo de ADCC son preferiblemente células asesinas activadas por linfoquinas (LAK, *por sus siglas en inglés*) de rata. Cuando los anticuerpos son humanizados, el ensayo de ADCC puede llevarse a cabo en particular sobre células NK humanas.

[66] Los anticuerpos de la invención que tienen propiedades citotóxicas y antagonistas para células CD127 positivas permiten los efectos acumulativos de estas propiedades con respecto al agotamiento de células T efectoras, especialmente de las células T de memoria, lo cual permite un mayor agotamiento (agotamiento del conjunto de células CD127+) y la correspondiente reducción en el número de células T diana

[67] Los párrafos anteriores, así como los Ejemplos, describen la manera de someter a ensayo las características funcionales deseadas de los anticuerpos que se proporcionan en la presente. En las siguientes secciones se explicarán en detalle diversas características estructurales y las posibles modificaciones de los anticuerpos. A la luz de estas orientaciones, el experto en la técnica será capaz de obtener anticuerpos con las características estructurales que se indican a continuación, junto con las características funcionales deseadas, en particular a partir del anticuerpo N13B2-hVL6 que tiene las características funcionales deseadas.

[68] Cuando se destinan a la administración a sujetos humanos, es deseable que los anticuerpos presenten una homología lo más fuerte posible con anticuerpos humanos, tal como ya lo sabe el experto en la técnica. El grado de identidad con un anticuerpo humano se mide como el porcentaje de residuos humanos en la secuencia del anticuerpo, en particular en el marco del dominio variable de la cadena liviana o de la cadena pesada del anticuerpo, es decir, el porcentaje de residuos en la secuencia del anticuerpo, en particular en el marco del dominio variable de la cadena liviana o de la cadena pesada del anticuerpo, que son idénticos en la misma posición funcional al residuo en el anticuerpo humano conocido más homólogo, en particular en el marco del dominio variable de la cadena liviana o de la cadena pesada del anticuerpo humano conocido más homólogo. En general, esta característica se expresa aquí, al igual que en la literatura, como “anticuerpo A (o la secuencia marco de su dominio variable) tiene un xx% de residuos humanos”, lo que significa que el anticuerpo A (o la secuencia marco de su dominio variable) tiene un xx% de residuos que son idénticos en la misma posición funcional a los residuos del anticuerpo humano conocido más homólogo (o la secuencia marco de su dominio variable). Tal grado de identidad puede medirse por medios que el experto conoce y, en particular, con la herramienta DomainGapAlign del Sistema de Información Internacional de Inmunogenética (IMGT, *por sus siglas en inglés*), según se aclaró durante la

sesión abierta del Grupo de Expertos del Catálogo Internacional de Nombres No-propietarios (INN, *por sus siglas en inglés*) de la OMS (abril de 2015). Preferentemente, los anticuerpos que se proporcionan en la presente tienen más del 80%, incluso más preferentemente al menos 84%, más de 84% e incluso con mayor preferencia al menos 85% de identidad con un anticuerpo humano, en particular, según se determina mediante la herramienta DomainGapAlign. Dicho grado de identidad puede determinarse solo para el dominio variable de la cadena liviana o solo para la cadena liviana (en comparación con un dominio variable de la cadena liviana o cadena liviana del anticuerpo humano) o para la cadena liviana y la cadena pesada tomadas en conjunto, mediante la comparación de cada cadena con la correspondiente cadena de anticuerpo humano más homólogo, e informando el porcentaje acumulado de identidad. En particular, el dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo o la cadena liviana del anticuerpo de acuerdo con la invención comprende al menos el 80%, más particularmente 84% e incluso más particularmente al menos 85% de residuos humanos. Los dominios variables de la cadena liviana del anticuerpo en particular que se proporcionan en la presente tienen, respectivamente, 84,2% (SEQ ID NO: 9); 85,3% (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11) y 86,3% (SEQ ID NO: 12) de residuos humanos. El dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo preferido que se proporciona en la presente (SEQ ID NO: 7) posee 90,8% de residuos humanos.

[69] Un dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo proporcionado en la presente puede comprender hasta 135 aminoácidos, preferiblemente hasta 120 aminoácidos y aún más preferiblemente hasta 110 o 107 aminoácidos. Un dominio variable de cadena liviana del anticuerpo que se proporciona en la presente puede comprender al menos 80, preferiblemente al menos 90 y aún más preferiblemente al menos 100 o 106 aminoácidos. Un dominio variable de cadena liviana del anticuerpo que se proporciona en la presente puede comprender 80 a 135, preferentemente 90 a 120 y más preferentemente 105 a 110 aminoácidos.

[70] Una cadena liviana del anticuerpo que se proporciona en la presente puede comprender hasta 250 aminoácidos, preferiblemente hasta 230 aminoácidos y aún más preferiblemente hasta 214 o 211 aminoácidos. Una cadena liviana del anticuerpo que se proporciona en la presente puede comprender al menos 150, preferiblemente al menos 190 y aún más preferiblemente al menos 200 o 210 aminoácidos. Una cadena liviana del anticuerpo que se proporciona en la presente puede comprender 150 a 250, preferentemente 190 a 230 y más preferentemente 210 a 220 aminoácidos.

[71] En la presente también se proporcionan polipéptidos que son: (i) fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos provistos en la presente, en particular fragmentos de unión a antígeno consistentes en, o compuestos por, un fragmento de las cadenas livianas del anticuerpo

o las regiones variables de la cadena liviana del anticuerpo que se proporciona en la presente, un dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo que se proporciona en la presente; y/o (ii) las moléculas miméticas de anticuerpo de los anticuerpos proporcionados en la presente.

[72] Un fragmento de unión a antígeno es un polipéptido que se une específicamente a la proteína CD127, según lo definido anteriormente en la sección pertinente (párrafos [44] a [47]) y comprende al menos las tres CDR de N13B2-h3 (que consisten en las secuencias de las SEQ ID NO: 4 a 6), preferiblemente un fragmento del dominio variable de la cadena liviana que se proporciona en la presente (con las SEQ ID NO: 9 a 12) que comprende dichas secuencias de las CDR. Un fragmento de unión a antígeno puede comprender de al menos 40, preferiblemente al menos 50 e incluso más preferiblemente al menos 70 o 74 aminoácidos. Un fragmento de unión a antígeno puede comprender como máximo 100, preferentemente como máximo 90 e incluso más preferentemente como máximo 80 o 74 aminoácidos. Un fragmento de unión a antígeno puede comprender 40 a 100, 50 a 90 y preferiblemente 60 a 100 e incluso más preferentemente 50 a 70 o 60 a 80 aminoácidos. Un fragmento de unión a antígeno con arreglo a lo dispuesto en la presente en particular, puede tener cualquiera de las características funcionales adecuadas que se divulgan respecto de los anticuerpos provistos en la presente, en particular las características reveladas en los párrafos [47] a [62].

[73] En tal sentido, un polipéptido aislado proporcionado en la presente puede constar de una secuencia de hasta 250 aminoácidos, en particular de hasta 217, de hasta 214, de hasta 211, más particularmente de hasta 200, de hasta 175, de hasta 150, de hasta 135, de hasta 120, de hasta 107 e incluso más particularmente de hasta 100, de hasta 90, de hasta 80, de hasta 74, de hasta 70, de hasta 60 aminoácidos.

[74] Una molécula de anticuerpo mimético es un polipéptido con propiedades similares a un anticuerpo, en particular con similares propiedades de unión a CD127. Los miméticos de anticuerpo pueden ser, por ejemplo, moléculas *affibody*, afilinas, afímeros, anticalinas, monocuerpos, etc. Una molécula mimética de anticuerpo provisto en la presente en particular, puede tener cualquiera de las características funcionales adecuadas que se divulgan respecto de los anticuerpos provistos en la presente, en particular las características descritas en los párrafos [47] a [62].

[75] En particular, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo humanizado, que comprende los dominios constantes derivados de los dominios constantes humanos. En particular, el dominio constante de la cadena liviana de anticuerpo deriva de un dominio constante de la cadena liviana kappa humana y/o el dominio constante de la cadena pesada del

anticuerpo deriva de una región constante de la cadena pesada de la IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas, particularmente de una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana. “Derivado de” significa algunas mutaciones puntuales mediante sustituciones de aminoácidos tales como IgG4 (S228P) o IgG1(E333A). Estas mutaciones bien conocidas para la persona experta en el arte, generalmente modifican algunas propiedades de la cadena parental. Por ejemplo, conducen a menor inmunogenicidad comparada con el anticuerpo parental o anulan la unión al receptor Fcγ o evitan la dimerización del anticuerpo monomérico o estabilizan la dimerización haciendo mejores a los anticuerpos para usos terapéuticos humanos. El anticuerpo de la invención derivado del dominio constante de la cadena liviana y pesada parental comprende o consiste en la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28 o un fragmento de las mismas, respectivamente. Más particularmente, el dominio constante de la cadena liviana del anticuerpo consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 27. En particular, el dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo comprende, o consiste en, la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 26 o un fragmento de la misma. Más particularmente, el dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 26.

[76] En la presente también se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido de acuerdo con la invención, o un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno provistos en la presente. En particular, dichas moléculas de ácido nucleico codifican el dominio variable de la cadena liviana o la cadena liviana de un anticuerpo provisto en la presente, en combinación con las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican la cadena pesada de un anticuerpo provisto en la presente, según cualquiera de las definiciones provistas en la presente descripción. En particular, en la presente se provee una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido que comprende, o que consiste en, una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12. En particular, la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la invención comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18. En particular, dicha molécula de ácido nucleico aislada se proporciona en combinación con una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una cadena pesada que comprende las tres CDR que consisten en las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; en particular que codifica un dominio variable de la cadena pesada de la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7 y, más particularmente la molécula de ácido nucleico aislada consistente en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 13. En una forma de realización preferida, se proporciona una

combinación de moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno, comprendiendo o consistiendo dicha combinación en una primera molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o consiste en, una secuencia seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18; y una segunda molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o consiste en, la secuencia de la SEQ ID NO: 13. En otra forma de realización preferida, se proporciona una combinación de moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno, comprendiendo o consistiendo dicha combinación en una primera molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o consiste en, la secuencia SEQ ID NO: 18; y una segunda molécula de ácido nucleico aislada que comprende, o consiste en, la secuencia de la SEQ ID NO: 13.

[77] En la presente también se proporcionan polinucleótidos que codifican la secuencia de polipéptidos de una cadena de ligera completa, que comprende tanto el dominio variable como el dominio constante, es decir, en particular polinucleótidos que codifican una de las secuencias de las SEQ ID NO: 9 a 12 y la secuencia SEQ ID NO: 27 o 28, en particular polinucleótidos que comprenden, o consisten en, una de las secuencias de las SEQ ID NO: 15 a 18 concatenada con la SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31. Dichos polinucleótidos se proveen particularmente en combinación con polinucleótidos que codifican la secuencia de polipéptidos de una cadena pesada completa, que comprende tanto el dominio variable como el dominio constante, es decir, en particular polinucleótidos que codifican la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de la SEQ ID NO: 26; en particular polinucleótidos que comprenden, o consisten en, la SEQ ID NO: 13 concatenada con la SEQ ID NO: 29.

[78] En particular, las moléculas de ácido nucleico aisladas proporcionadas en la presente pueden comprender ventajosamente además de una secuencia que codifica una cadena liviana y opcionalmente una cadena pesada de un anticuerpo que se proporciona en la presente, aguas arriba de la secuencia que codifica dichas cadenas de anticuerpos, una secuencia que codifica un péptido señal que permite la secreción de dichas cadenas cuando se expresan en una célula productora. También pueden incluir una o más secuencias que codifican uno o varios péptidos marcadores para detectar y/o facilitar la purificación de dichas cadenas.

[79] En la presente también se proporciona un vector para la clonación o para la expresión de una molécula de ácido nucleico provista en la presente. En particular, dicho vector es un plásmido adecuado para la clonación o la expresión en células de mamíferos, que comprende secuencias de regulación para la transcripción y expresión. En consecuencia, en la presente se

proporciona un vector que comprende un polinucleótido descripto previamente, en particular un polinucleótido como se divulga en los párrafos [76] a [78].

[80] Asimismo, en la presente se proporcionan células o líneas celulares recombinadas con una molécula de ácido nucleico, como se indicó previamente, en particular un vector, especialmente una célula o línea celular de mamífero o aviar, especialmente como se detalla en la Figura 2. Por ejemplo, células de ovario de hámster chino, genéticamente modificadas para reducir la fucosilación global. En efecto, los anticuerpos que carecen de fucosilación en núcleo muestran una citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC) significativamente mejorada (von Horsten *et al.*, 2010). Otro ejemplo es la línea celular EB66 que naturalmente tiene bajas propiedades de fucosilación (Olivier *et al.*, 2010). También se pueden producir anticuerpos en células transfectadas transitoriamente con una molécula de ácido nucleico, según lo indicado, en particular un vector, en particular células COS, particularmente como se detalla en el Ejemplo 2.

[81] En la presente también se proveen métodos para producir un polipéptido provisto en la presente, en particular una cadena liviana de anticuerpo o un anticuerpo monoclonal; comprendiendo dichos métodos la etapa de expresar dicho polipéptido, cadena liviana de anticuerpo, anticuerpo monoclonal (o la cadena liviana y opcionalmente la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal) en células que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, en condiciones que permiten la recuperación de dicho polipéptido y la etapa de recuperar dicho polipéptido. En particular, los anticuerpos o su fragmento se preparan en células que presentan escasas propiedades de fucosilación, tal como las células EB66 aviares.

[82] También en la presente se provee una composición farmacéutica que comprende un polipéptido (en particular un dominio variable de la cadena liviana de anticuerpo o una cadena liviana de anticuerpo) y/o un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o molécula mimética de anticuerpo del mismo y/o una molécula de ácido nucleico aislada como se definió anteriormente, y un vehículo farmacéutico. De manera opcional, dicha composición farmacéutica también puede comprender un ingrediente activo diferente. En particular, dicha composición se provee en una formulación adecuada para la administración sistémica o para la administración local. Especialmente, en la presente se proporcionan composiciones adecuadas para la administración local, en particular para la inyección subcutánea o intramuscular, para inyección utilizando un dispositivo tal como un autoinyector (o inyector tipo lápiz), para la administración transdérmica, en particular mediante un parche transdérmico, para administración transmucosal, en particular la administración rectal o intranasal. En particular, las composiciones aquí suministradas son adecuadas para la administración local en el tracto

gastrointestinal (TG), en particular mediante la administración por vía oral, en particular para el tratamiento de enfermedades intestinales, tales como la enfermedad de Crohn o UC, especialmente composiciones adecuadas para su administración en el colon. En particular, en la presente se proveen composiciones convenientes para la administración sistémica, en particular para la administración parenteral o enteral, especialmente para inyección intravenosa o administración oral. Tal como es de conocimiento del experto en la técnica, la administración entérica puede ser una administración local al tracto gastrointestinal o una administración sistémica. Toda vez que dichas composiciones farmacéuticas o sus usos se consignan en la presente, debe entenderse que el vehículo de administración y sus usos también pueden proveerse, por ejemplo, cuando una composición farmacéutica inyectable se provee explícitamente; debe entenderse que la composición se provee como tal también en un dispositivo o en combinación con un dispositivo que permite la administración y/o la inyección de dicha composición (“dispositivo de administración”). Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, sin carácter restrictivo, autoinyectores, en particular jeringas multicámaras y parches transdérmicos. En consecuencia, en la presente se proporciona un dispositivo de administración, en particular un autoinyector, una bomba o un parche transdérmico que comprende dicha composición y la utilización de los mismos como se indica a continuación en relación con las composiciones farmacéuticas. En la presente también se proporciona un kit compuesto por una composición farmacéutica y un dispositivo de suministro local, en particular un dispositivo de suministro subcutáneo, entérico u oral, en particular una jeringa precargada o un dispositivo sin aguja, que contiene dicha composición y/o es adecuado para la administración de dicha composición, y sus usos, según se provee a continuación en relación con las composiciones farmacéuticas. La composición farmacéutica se provee en cualquier forma adecuada para la administración, incluso como una solución, en particular una solución acuosa estéril, tal como una suspensión, un sólido, en particular un sólido liofilizado, especialmente para la absorción sobre (o adsorbido sobre) un parche y/o para re-suspensión y administración en forma de solución, píldora, comprimido u otra forma sólida adecuada para la administración por vía oral, en particular con liberación retardada o prolongada, como nanopartículas, por ejemplo, una composición que comprende nanopartículas con el polipéptido adsorbido en la superficie o dentro de dichas nanopartículas, etc. La forma de la composición farmacéutica y, opcionalmente, la naturaleza del dispositivo de administración pueden ser adecuadas para el suministro del ingrediente activo según lo establecido en la presente en forma sistémica o local, es decir, pueden ser aptas para que el ingrediente activo alcance los tejidos, células u órganos diana en un estado activo. En particular, la forma de la composición

farmacéutica y, opcionalmente, la naturaleza del dispositivo de administración pueden ser adecuadas para el suministro en el tracto gastrointestinal, en particular en el colon. Se sostiene que la composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable; sin embargo, también se proporcionan composiciones farmacéuticas sin un portador para usos y propósitos similares, cuando no se requiere dicho portador para uso farmacéutico, por ejemplo, si el producto se administra como un sólido liofilizado puro. En particular, la administración se realiza de acuerdo con cualquier medio adecuado según lo descrito aquí para la liberación intestinal, especialmente liberación retardada en el intestino.

[83] En la presente también se proporciona una composición que comprende, como ingrediente activo, un polipéptido (en particular un dominio variable de la cadena liviana de anticuerpo o cadena liviana de anticuerpo) y/o un anticuerpo (en particular un anticuerpo monoclonal), un fragmento de unión a antígeno, una molécula mimética de anticuerpo del mismo, como se definió anteriormente, o una composición farmacéutica según lo definido más arriba, en una formulación adecuada para controlar la supervivencia o expansión de células CD127 positivas humanas, en particular células efectoras CD127 positivas humanas, especialmente la supervivencia o expansión de células T CD127+ de memoria, especialmente células T de memoria que son células CD127+ y CD8+ o que son células CD127+ y CD4+, cuando se administra a un paciente humano. En particular, dicha composición que comprende el anticuerpo (u otro agente como se indicó anteriormente) como ingrediente activo está en una formulación adecuada para controlar la diferenciación y/o la maduración de las células dendríticas cuando se administra a un paciente.

[84] Sorprendentemente, los inventores han demostrado que una sola inyección del anticuerpo que provisto en la presente permite lograr un efecto sostenido, y la respuesta inflamatoria aún es significativamente reducida en los animales tratados con una inyección única de los anticuerpos proporcionados hasta los 14 meses, e incluso hasta los 18 meses siguientes a dicha inyección única. La administración, y preferiblemente una administración única, del polipéptido, en particular la cadena liviana del anticuerpo y, más particularmente, el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno o molécula mimética del anticuerpo del mismo que se proporciona en la presente, preferiblemente tiene un efecto rápido y/o de larga duración sobre las células T efectoras de memoria. Se observa un rápido efecto preferentemente dentro de una semana, y preferiblemente dentro de las 48 horas, e incluso más preferentemente dentro de un día desde la administración de dicho polipéptido, cadena de anticuerpos o anticuerpo. Preferiblemente, se observa un efecto de larga duración al menos 12 meses, y más preferiblemente al menos 14 meses después de la administración más reciente (y,

preferiblemente, la única) de dicho polipéptido, cadena de anticuerpos o anticuerpo. Tal efecto es particularmente reversible (en particular, la respuesta de células T puede restablecerse por la nueva vacunación). Preferiblemente, tal efecto es específico para el antígeno y/o para la respuesta y, preferiblemente, no se asocia con el linfagotamiento medible (es decir, el número global de linfocitos no se reduce en el sujeto, según se mide con la aplicación de métodos comunes). Este efecto también puede definirse como una supresión clonal de las células T de memoria, o como una supresión reversible específica del antígeno de las células T de memoria. Un efecto de dicha administración sobre las células T efectoras de memoria puede evaluarse comparando los niveles de células secretoras de IFN- γ (medidos, por ejemplo, mediante ELISPOT) en respuesta a un antígeno, por ejemplo tuberculina, en sujetos vacunados (en particular en los babuinos) que posteriormente fueron tratados con el polipéptido, cadena de anticuerpo o anticuerpo monoclonal provistos en la presente y en sujetos vacunados no tratados: se observa un efecto si el nivel medido de células T específicas de antígeno es significativamente inferior (preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 40% menor) en los sujetos tratados, en el correspondiente punto de tiempo después del tratamiento. Este efecto también se puede medir mediante la evaluación de la respuesta inflamatoria a un antígeno determinado, por ejemplo, una reacción inflamatoria local, en particular dérmica, en respuesta a un antígeno administrado en forma local. Como alternativa, se puede utilizar un ensayo de tetrámeros de MHC. El experto en la técnica conoce los métodos de ensayo para tal efecto y se ilustran aquí, en particular en el Ejemplo 6.

[85] Además, los inventores han mostrado sorprendentemente que el anticuerpo que se proporciona en la presente puede tener un efecto rápido, en particular sobre la activación de las células T, en particular sobre la liberación de citoquinas por las células T, en particular en el tejido inflamatorio. Este efecto se observa en particular dentro de una semana, y preferiblemente dentro de las 48 e incluso más preferiblemente dentro de las 24 horas desde la administración del anticuerpo, y, en particular, se observa como una reducción en la producción (o liberación) de IFN γ . En especial, este efecto se observa localmente, es decir en el sitio de administración del anticuerpo o en el lugar de suministro. En particular, el anticuerpo que se proporciona en la presente tiene un rápido efecto, en particular un rápido efecto local, especialmente sobre la liberación de citoquinas producidas por las células T, en particular tiene un efecto observado dentro de las 24 horas de la administración. Cuando el anticuerpo es administrado para el suministro local, pero no directamente en el sitio de suministro previsto, el anticuerpo puede tener efecto rápido, como se indicó previamente, en el sitio de suministro,

dentro de los mismos plazos desde el suministro en lugar de la administración, que puede o no retardarse desde la administración, tal como lo conoce el experto en la técnica.

[86] Una composición proporcionada aquí también puede comprender un compuesto adicional que tiene un efecto inmunomodulador terapéutico, en particular sobre las células implicadas en la alergia o autoinmunidad. Para propósitos ilustrativos, los ejemplos de inmunomoduladores de interés son otros anticuerpos monoclonales con diana en las células T, tales como los anticuerpos anti-CD3, anti-ICOS o anti-CD28 o proteínas recombinantes o anticuerpos con diana en células accesorias como CTLA4Ig o anticuerpos anti-CD40.

[87] El polipéptido, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o molécula mimética de anticuerpo del mismo, molécula de ácido nucleico aislada, célula o composición que se provee en la presente pueden proporcionarse en un producto combinado, compuesto por productos adicionales, en particular un agente con efecto inmunomodulador terapéutico como se indicó anteriormente, en particular destinado para la administración simultánea, secuencialmente o en forma separada. En la presente se provee un producto de combinación que comprende un polipéptido (en particular un dominio variable de la cadena liviana de anticuerpo o una cadena liviana de anticuerpo), un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o molécula mimética del anticuerpo del mismo, una molécula de ácido nucleico aislada, vector, célula o línea celular o una composición farmacéutica como se definió anteriormente y que de manera opcional también comprende:

- un agente con efecto inmunomodulador terapéutico, en particular destinado a la administración en combinación con, por ejemplo, el anticuerpo que se provee en la presente, en particular donde dicha administración es simultánea o separada en el tiempo, y/o donde dicha administración es a través de la misma ruta o una ruta diferente; y/o
- un dispositivo para la administración del producto.

[88] Un polipéptido, en particular una cadena liviana del anticuerpo y/o un anticuerpo, en particular un anticuerpo monoclonal, y/o un fragmento de unión a antígeno, o una molécula mimética del anticuerpo, y/o un ácido nucleico, un vector, una célula o una línea celular y/o una composición farmacéutica o una composición definida anteriormente, en particular, están provistos para su utilización en un paciente humano para tratar patologías o afecciones patológicas influenciadas por respuestas inmunes, especialmente por las respuestas de las células T de memoria. Tales afecciones o patologías comprenden aquellas inducidas por el rechazo del trasplante, enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas, enfermedades

respiratorias, infecciones virales crónicas, enfermedad inflamatoria crónica, en particular enfermedad inflamatoria intestinal crónica, linfoma, leucemia u otras enfermedades relacionadas con el cáncer, incluidas aquellas derivadas de tumores sólidos, cuando estas patologías están asociadas con células CD127 positivas así como la vía de señalización de IL-7, en particular cuando debe evitarse el incremento en la maduración de las células dendríticas. En consecuencia, los inventores muestran que se puede contemplar el uso de dichos agentes para el tratamiento de determinados trastornos alérgicos de la piel, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en particular la enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerativa (CU), o síndrome de Sjögren primario, o lupus eritematoso sistémico, o esclerosis sistémica o esclerosis múltiple, o diabetes tipo I o leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, T-ALL), o linfoma de Hodgkin, o cáncer de mama asociado con las células CD127+, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, o para el tratamiento de un linfoma cutáneo de células T, tal como el linfoma de Sezary, o para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda con mutación de ganancia de función de la vía IL-7-R/TSRP, para el tratamiento del rechazo del trasplante y/o de pacientes que necesitan un trasplante y/o están a punto de someterse a un trasplante y/o han sido sometidos a un trasplante. El tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en particular la enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerativa (CU), o síndrome de Sjögren primario, o lupus eritematoso sistémico, o esclerosis sistémica o esclerosis múltiple o diabetes tipo I se contempla en las formas de realización preferidas. En particular, la invención se refiere al polipéptido, o al anticuerpo, o a fragmento de unión a antígeno, o a molécula mimética del anticuerpo de mismo, o a la molécula de ácido nucleico aislada o a la composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su empleo como medicamento, especialmente para su uso en la prevención o el tratamiento del rechazo del trasplante de órganos o tejidos o de una enfermedad que se selecciona del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, especialmente artritis reumatoide, esclerosis sistémica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, tiroiditis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren primario, y enfermedades inflamatorias, especialmente la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), más particularmente, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, encefalomiелitis, enfermedades alérgicas, enfermedades relacionadas con el cáncer, enfermedades relacionadas con el trasplante y enfermedades respiratorias, preferiblemente por administración local.

[89] En la presente se proporcionan los usos del polipéptido, cadena liviana de anticuerpo o anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o molécula mimética del anticuerpo del mismo en el tratamiento de estados patológicos que implican la alteración de la respuesta inmune en un paciente humano que conduce al estado tolerogénico dominante o, por el contrario, la falta de

tolerancia cuando se necesita el control del nivel de la respuesta inmune, así como la destrucción de células malignas CD127 positivas.

[90] Por “*tratamiento*” o “*tratamiento terapéutico*” se entiende que las etapas de administración realizadas dan como resultado una mejora de la condición clínica de un animal o un paciente humano, que lo necesita, que padece uno o más trastornos asociados con la vía IL-7, es decir, que involucran la activación o proliferación de células CD127 positivas. Dicho tratamiento tiene por objeto mejorar el estado clínico del animal o paciente humano, al eliminar o aliviar los síntomas asociados con los trastornos relacionados con la vía IL-7, es decir, que involucran la activación o proliferación de células CD127 positivas. Preferiblemente, el tratamiento proporcionado en este documento permite restablecer el estado de salud. Preferiblemente, dicho tratamiento no tiene efectos negativos no deseados debido al aumento de la maduración de las células inmunes, en particular de las células dendríticas.

[91] En aspectos particulares del tratamiento de pacientes, el polipéptido, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula mimética del anticuerpo, polinucleótido, célula, línea celular o composición se proveen, se destinan o son adecuados para su empleo a fin de agotar las células CD127 positivas a la vez que se preservan las células CD127 negativas.

[92] En aspectos particulares del tratamiento de los pacientes, el uso del polipéptido, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula mimética del anticuerpo, polinucleótido, célula, línea celular o composición se provee, se destina o resulta adecuado para su utilización a fin de prevenir la diferenciación y/o expansión y/o maduración de células CD127 positivas, en particular la diferenciación, expansión o maduración inducida por IL-7 y/o TSLP, mientras que tiene escaso o ningún efecto directo sobre las células CD127 negativas.

[93] En aspectos particulares del tratamiento de pacientes, el uso del polipéptido, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula mimética del anticuerpo, polinucleótido, célula, línea celular o composición se provee, destina y/o resulta adecuado para eliminar/neutralizar células T de memoria y vírgenes mediante la interferencia con la señalización inducida por IL-7, a la vez que se preservan las células Treg.

[94] En aspectos particulares del tratamiento de los pacientes, el uso del polipéptido, anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula mimética del anticuerpo, polinucleótido, célula, línea celular o composición se provee, destina o resulta adecuado para agotar subpoblaciones de linfocitos u otras poblaciones de células que expresan CD127 (incluidos los linfocitos T y B normales o patológicos, células NK, células dendríticas y otros tipos celulares, incluidas las células epiteliales) como resultado de la acción citotóxica de los anticuerpos,

posiblemente pero no exclusivamente a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, *por sus siglas en inglés*) y opcionalmente a través de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, *por sus siglas en inglés*).

[95] En la presente también se proporciona un polipéptido, en particular una cadena liviana de anticuerpo y/o un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, molécula mimética del anticuerpo, polinucleótido, célula, línea celular o composición como se definió anteriormente, para su uso como ingrediente activo en una combinación o régimen terapéutico adicional en un paciente que lo necesita. También se proporciona el uso de un polipéptido, en particular una cadena liviana de anticuerpo y/o un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, molécula mimética de anticuerpo, polinucleótido, célula, línea celular o una composición definida anteriormente como ingrediente terapéuticamente activo en una combinación o en un régimen terapéutico complementario que se administra a un paciente que lo necesita.

[96] En los aspectos anteriores, los usos contemplados también son aplicables a los ácidos nucleicos, vectores, células, líneas celulares, composiciones y composiciones farmacéuticas provistos en la presente más arriba.

[97] En la presente, se proporcionan los medios y productos indicados previamente destinados o adecuados para el uso en patologías, tales como aquellas inducidas por el rechazo del trasplante, enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas, enfermedades respiratorias, infecciones virales crónicas, enfermedad inflamatoria crónica, en particular enfermedad inflamatoria intestinal crónica, linfoma, leucemia u otras enfermedades relacionadas con cáncer, incluyendo aquellas derivadas de tumores sólidos, cuando estas patologías están asociadas con células CD127 positivas así como la vía de señalización de IL-7, en particular cuando debe evitarse el incremento en la maduración de las células dendríticas. En consecuencia, dichos medios y productos están especialmente destinados o resultan adecuados para el tratamiento de determinados trastornos alérgicos de la piel, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en particular la enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerativa (CU), leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, T-ALL), linfoma de Hodgkin, cáncer de mama asociado con las células CD127+, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, o para el tratamiento de un linfoma cutáneo de células T, tal como el linfoma de Sezary, o para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda con mutación de ganancia de función de la vía IL-7-R/TSLP o para el tratamiento del rechazo del trasplante y/o de pacientes que necesitan un trasplante, y/o que están a punto de someterse a un trasplante y/o que han sido sometidos a un trasplante.

[98] En particular, en la presente se provee el uso de un polipéptido, en particular una cadena liviana de anticuerpo y/o anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, molécula mimética de anticuerpo, ácido nucleico, célula, línea celular o composición en un paciente humano para el tratamiento de afecciones o patologías inducidas por el rechazo de trasplantes, enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas, enfermedades respiratorias, infecciones virales crónicas, enfermedad inflamatoria crónica, en particular, enfermedad inflamatoria intestinal crónica, linfoma, leucemia u otras enfermedades relacionadas con cáncer, incluidas aquellas resultantes de tumores sólidos, cuando estas patologías están asociadas con células CD127 positivas así como la vía de señalización de IL-7, en particular cuando debe evitarse el incremento en la maduración de las células dendríticas. En consecuencia, dichos productos son especialmente adecuados para el tratamiento de determinados trastornos alérgicos de la piel, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en particular la enfermedad de Crohn (EC), o colitis ulcerativa (CU), o leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, T-ALL), o linfoma de Hodgkin, o cáncer de mama asociado con las células CD127+, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, o para el tratamiento de un linfoma cutáneo de células T, tal como el linfoma de Sezary, o para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda con mutación de ganancia de función de la vía IL-7-R/TSLP o para el tratamiento del rechazo del trasplante o de pacientes que lo necesitan, y/o que están a punto de someterse a un trasplante y/o que han sido sometidos a un trasplante, que padecen una enfermedad autoinmune o una enfermedad alérgica o para el tratamiento de leucemia, tal como leucemia linfoblástica aguda, para el tratamiento de linfoma, para el tratamiento del cáncer, para el tratamiento de una infección viral crónica, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular EII, especialmente EC o CU, o para el tratamiento de enfermedades respiratorias, o bien para la prevención o el tratamiento de síntomas relacionados con trasplantes.

[99] En particular, se proporciona en la presente un método de tratamiento que comprende la administración de un polipéptido (en particular un dominio variable de la cadena liviana de anticuerpo o una cadena liviana de anticuerpo) y/o un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula mimética del anticuerpo, o molécula de ácido nucleico aislada, célula, y/o línea celular, o una composición y/o una composición farmacéutica según lo definido anteriormente a un paciente humano para el tratamiento de afecciones o patologías inducidas por el rechazo de trasplantes, enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas, enfermedades respiratorias, infecciones virales crónicas, enfermedad inflamatoria crónica, en particular enfermedad inflamatoria intestinal crónica, linfoma, leucemia, u otras enfermedades relacionadas con cáncer, incluyendo aquellas derivadas de tumores sólidos cuando estas

patologías están asociadas con células CD127 positivas así como la vía de señalización de IL-7, en particular cuando debe evitarse el incremento en la maduración de las células dendríticas. En consecuencia, dichos métodos son especialmente adecuados para el tratamiento de determinados trastornos alérgicos de la piel, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en particular la enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerativa (CU), o leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, T-ALL), o linfoma de Hodgkin, o cáncer de mama asociado con las células CD127+, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, o para el tratamiento de un linfoma cutáneo de células T, tal como el linfoma de Sezary, o para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda con mutación de ganancia de función de la vía IL-7-R/TSLP o para el tratamiento del rechazo de trasplantes y/o de pacientes que necesitan un trasplante, y/o que están a punto de someterse a un trasplante o que han sido sometidos a un trasplante, el tratamiento de una enfermedad autoinmune o una enfermedad alérgica o para el tratamiento de leucemia, tal como leucemia linfoblástica aguda o para el tratamiento de linfoma, o para el tratamiento del cáncer, o para el tratamiento de una infección viral crónica, o para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular EII, especialmente EC o CU, o para el tratamiento de enfermedades respiratorias o para la prevención o el tratamiento de síntomas relacionados con trasplantes.

[100] Los inventores también han demostrado que, en los pacientes con CU, los niveles de ARNm de IL7, CD127 o TSLPR permiten predecir la respuesta a los tratamientos inmunosupresores convencionales: los respondedores (es decir, los pacientes que presentan una marcada reducción de los síntomas en respuesta al tratamiento) tienen niveles más bajos de IL-7 y CD127 y mayores niveles de TSLPR que los no respondedores. En consecuencia, aquí se proporcionan métodos *in vivo* para evaluar la probabilidad de respuesta a tratamientos inmunosupresores en pacientes, en particular en pacientes humanos que padecen colitis ulcerativa (CU), que comprenden la medición en una muestra tomada a dichos pacientes del nivel de ARNm o proteína de IL7, CD127, TSLPR, y se llegó a la conclusión de que la probabilidad de respuesta es mayor en comparación con un grupo de referencia cuando el nivel medido de IL7 o CD127 es inferior al nivel promedio de dicho grupo, y/o cuando el nivel medido de TSLPR es mayor que el nivel promedio en dicho grupo. Los expertos en la técnica conocen los métodos para realizar las mediciones requeridas y pueden implicar el uso de un anticuerpo contra CD127 en particular para la medición de los niveles de expresión de proteína de CD127. El polipéptido, particularmente la cadena liviana del anticuerpo o el anticuerpo monoclonal que se proporcionó anteriormente, se indica especialmente para su uso en tales

métodos y tales métodos son provistos en particular usando un polipéptido, una cadena liviana de anticuerpo y/o el anticuerpo monoclonal.

[101] En particular, en la presente se provee un método para seleccionar un compuesto del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento del mismo de unión a antígeno y una molécula mimética de anticuerpo; comprendiendo el método al menos uno de las siguientes etapas:

- i. ensayar la unión del compuesto a CD127, en particular a CD127 humano, en particular a una secuencia de epítopes del dominio D1 y/o del sitio 2b del dominio D2 de CD127. Una secuencia de epítopes del dominio D1 y/o del sitio 2b del dominio D2 puede ser cualquiera de las secuencias de epítopes descriptas, especialmente como se revela en el párrafo [016], particularmente una secuencia de epítopes seleccionada del grupo consistente en SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO 35, SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 96, y más particularmente SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 96. En una forma de realización de la invención, el ensayo de unión puede abarcar ensayar la unión del compuesto a una secuencia de epítopes seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 96 y ensayar la unión del compuesto a una secuencia de epítopes seleccionada del grupo consistente en la SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43. La capacidad de unión del compuesto puede ensayarse mediante la utilización de cualquiera de los métodos que se conocen en la técnica, en particular el método de Blitz, que los expertos en la técnica conocen y que específicamente se ilustran en la Figura 3, en el Ejemplo 3 y el Ejemplo 4 de la presente, y en la página 14, figuras 3, 4 y 6 y las respectivas leyendas, y los ejemplos 1, 2, 6, 7 de la WO 2015/189302; y/o mediante el método del Ejemplo 10 que se da a conocer en la presente; y/o
- ii. ensayar la inhibición de la señalización de IL7-R inducida por IL-7, en particular, la fosforilación de STAT5, en presencia del compuesto. La inhibición inducida por IL7 en presencia del compuesto puede ser ensayada mediante el método que se describe en el Ejemplo 8 y/o el Ejemplo 11 de la presente; y/o
- iii. ensayar la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa en presencia del compuesto. La activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa en presencia del compuesto puede ser ensayada de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8 y/o el Ejemplo 11 de la presente; y/o

- iv. ensayar la activación de la vía de señalización de ERK en presencia del compuesto. La activación de la vía de señalización de ERK en presencia del compuesto puede someterse a ensayo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8 y/o 11 de la presente;
- v. ensayar la capacidad de unión del compuesto a al menos una lámina beta del sitio 2b del dominio D2 de CD127, en particular, al menos a la tercera lámina beta del sitio 2b, que se define como los ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 34, y/o a al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de la SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 96. La capacidad de unión del compuesto puede ser ensayada mediante la utilización de cualquiera de los métodos que se conocen en la técnica, en particular el método de Blitz, que los expertos en la técnica conocen y que específicamente se ilustra en la Figura 3, en el Ejemplo 3 y Ejemplo 4 de la presente, como así también en la página 14, figuras 3, 4 y 6 y las respectivas leyendas, y los ejemplos 1, 2, 6, 7 de la WO 2015/189302; y/o mediante el método del Ejemplo 10 descrito en la presente.

El método también puede incluir cualquiera de los siguientes pasos opcionales, o al menos uno de los siguientes pasos opcionales:

- vi. ensayar la unión de CD127, en particular CD127 humano, a la cadena común γ c de receptores de citoquinas en presencia del compuesto. La unión de CD127 a la cadena común γ c de los receptores de citoquina en presencia del compuesto puede evaluarse, en particular mediante métodos de coinmunoprecipitación, que son bien conocidos por el experto en la técnica para ensayar la interacción de las proteínas y se ilustra por ejemplo en el ejemplo 21 de la WO 2015/189302. En particular, las células pueden incubarse en presencia o ausencia del compuesto ensayado, luego solubilizarse en condiciones que permitan la preservación de complejos proteicos, y el lisado resultante puede ser sometido a una inmunoprecipitación anti-CD127 y la presencia de γ c en el complejo inmunoprecipitado que contiene CD127 evaluada mediante la técnica de Western Blotting con anticuerpos anti- γ c (a la inversa, la inmunoprecipitación puede realizarse utilizando anticuerpos anti- γ c y la presencia de CD127 evaluarse con el empleo de anticuerpos anti-CD127); y/o
- vii. ensayar la internalización de CD127, en particular CD127 humano, y/o internalización inducida por IL7 de CD127 en presencia del compuesto. La internalización de CD127, que aquí se define en los párrafos [51] a [53], también

puede definirse y/o ensayarse de la manera que se enuncia en la WO 2015/189302, en particular en los párrafos [59]-[63] de las páginas 19-20 y en la figura 16 y el ejemplo 5; y/o

- viii. ensayar la maduración de las células dendríticas inducida por TSLP en presencia del compuesto. La maduración de las células dendríticas inducida por TSLP está definida en los párrafos [47] y [48] de la presente. Los medios para medir ese efecto son conocidos por el experto en la técnica y se divulgan en particular en las páginas 16-17 de la WO 2015/189302 y en el ejemplo 9 de esa solicitud. En particular, los medios para medir tales efectos comprenden medir la expresión de CD40 entre células estimuladas con el compuesto y células estimuladas solo con TSLP (sin el compuesto).

En una forma de realización particular del método, se selecciona el compuesto que se une específicamente a CD127, en particular CD127 humano, que es un antagonista de la señalización de IL7-R inducida por IL7, que no induce la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa y/o la vía de señalización de ERK. En una forma de realización más específica del método, se selecciona el compuesto que específicamente se une a CD127, en particular CD127 humano, que es un antagonista de la señalización de IL7-R inducida por IL7, y que no induce la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa ni tampoco la activación de la vía de señalización de ERK.

[102] En particular, en la presente se proporciona un método para producir un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con la invención, que surge contra CD127 y posiblemente surge a partir de una inmunización de un animal no humano, como las ratas de la cepa LOU/C1gk1 (disponibles en la universidad de Lovaina, Bélgica). La inmunización puede realizarse con el empleo de un fragmento de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y, en particular, un fragmento de la SEQ ID NO: 22 que comprende una secuencia de epítopes como se define en la presente y, en particular, la SEQ ID NO: 35 y/o SEQ ID NO: 96, como inmunógeno. Se puede obtener un hibridoma mediante la fusión de células mononucleares del bazo con la inmunocitoma IR983F de rata LOU. El hibridoma se puede seleccionar de acuerdo con la capacidad de los anticuerpos monoclonales secretados que se unen a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 96, en particular SEQ ID NO: 35 y/o SEQ ID NO: 96. Por lo tanto, la invención también abarca un compuesto inmunógeno, siendo dicho compuesto inmunógeno un fragmento de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22, en particular un fragmento que comprende al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de

SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 96, en particular, SEQ No. 34, SEQ ID No. 35 y SEQ ID No. 96, more particularly SEQ ID NO: 96. En una forma de realización de la invención, el compuesto inmunógeno es un péptido lineal, en particular un péptido lineal que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96, más particularmente, un péptido lineal que comprende o consiste en, preferiblemente que consiste en, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 35.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos que se proveen en la presente

Panel A. Secuencia de la cadena pesada (VH). Las CDR están en negrita.

Panel B. Secuencia de las cadenas livianas (LH) humanizadas derivadas de N13B2. Las CDR están en negrita. N13B2-VL3 comprende residuos de marco originales de N13B2-h3 en las posiciones 48 y 87 (subrayados); N13B2-VL4-V48L y N13B2-VL5-F87y comprenden el correspondiente residuo de marco humanizado y N13B2-VL6-V48L-F87S comprende ambos residuos de marco humanizados.

Figura 2. Producción de anticuerpos - transfección estables

Se realizaron tres lotes diferentes de producción para cada uno de los mencionados anticuerpos en células CHO-M de acuerdo con los métodos comunes, utilizando medios libres de suero de grado comercial, y se informan los títulos obtenidos en experimentos típicos, medidos con la técnica ELISA. El eje horizontal representa el tiempo de cultivo, en días, mientras el eje vertical representa los títulos del anticuerpo que se obtuvieron en µg/mL.

Figura 3. Unión a CD127

Se ensayó la unión de los anticuerpos indicados a CD127 recombinante mediante ELISA de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3. El eje horizontal representa la concentración de anticuerpos en ng/mL, y el eje vertical representa la densidad óptica a 450 nm, en unidades arbitrarias.

Figura 4. Inhibición de la fosforilación de STAT5

La inhibición de la fosforilación de STAT5 por los anticuerpos indicados fue ensayada por citometría de flujo de acuerdo con el método detallado en el Ejemplo 5. El porcentaje de células CD3+ teñidas con anticuerpos pSTAT5 se informa en el panel A (eje horizontal: concentración de anticuerpos en ng/mL) y se informa la intensidad promedio de fluorescencia (en unidades arbitrarias) de la señal pSTAT5 para las células CD3+ en el panel B.

Figura 5. Efecto sobre las células T de memoria

Panel A. Respuesta DTH (área bajo la curva de curvas de eritema) en babuinos después de la inyección de N13B2.

La hipersensibilidad de tipo retardado en respuesta a un desafío de tuberculina fue ensayada en babuinos vacunados, después de la administración de N13B2 (n = 7 babuinos) o excipiente (n = 4 babuinos), mediante la medición de la reacción dérmica de acuerdo con el método detallado en el Ejemplo 6. El eje vertical representa el área bajo la curva de eritema en unidades arbitrarias. Los valores se informan para reacciones intradérmicas realizadas en puntos de tiempo dados, indicados en días en el eje horizontal, antes o después de la administración de N13B2 o excipiente (administrados el día 0). “Pos-BCG” corresponde a los resultados de reacción dérmica llevada a cabo después de una nueva vacuna con BCG (nd = no determinado).

El control de excipiente no fue determinado en los días 150 y 180 y “pos-BCG” (nd).

Panel B.

Respuesta de DTH (área bajo la curva de las curvas de eritema) en babuinos después de la inyección de N13B2 humanizado.

La hipersensibilidad de tipo retardado en respuesta a un desafío de tuberculina se sometió a prueba en babuinos vacunados, después de la administración de anticuerpo N13B2 humanizado (AA892BB, 32257, V915GQ, 33874) o buffer, mediante la medición de la reacción dérmica de acuerdo con el método que se detalla en el Ejemplo 6. El eje vertical representa el área bajo la curva de eritema en unidades arbitrarias. Los valores son informados para reacciones intradérmicas realizadas antes de la administración de N13B2 humanizado o buffer (“IDR1”, primera barra desde la izquierda para cada babuino), 4 horas después de la administración de N13B2 humanizado o buffer (“IDR2”, segunda barra desde la izquierda) uno, dos y tres meses (“IDR3-5”, barras tercera a quinta desde la izquierda) y cuatro meses (“IDR6”, sexta barra desde la izquierda, para V915GA solamente) después de la administración de N13B2 humanizado o buffer y después una nueva vacunación con BCG (“IDR7”, última barra desde la izquierda).

Panel C.

Se realiza ELISPOT IFN γ en PBMC de sangre en babuinos vacunados con BCG desafiados con tuberculina y tratados con N13B2 humanizado.

La frecuencia de células T específicas para AG después del desafío de tuberculina fue ensayada en babuinos vacunados, tras la administración de N13B2 humanizado (AA892BB, 32257,

V915GQ, 33874) o buffer, mediante el ensayo ELISPOT IFN γ de acuerdo con el método que se detalla en el Ejemplo 6. El eje vertical representa la frecuencia de puntos para 100.000 células. Los valores son informados para Elispot sin antígeno (sin Ag, barras de la izquierda) o con antígeno tuberculina (barras de la derecha) realizadas antes de la administración de N13B2 humanizado o buffer (primera barra desde la izquierda para cada grupo de barras), 4 días después de la administración de N13B2 humanizado o buffer (“IDR2”), uno, dos y tres meses (“IDR3-5”), y cuatro meses (“IDR6”, para V915GA solamente) después de la administración de N13B2 humanizado o buffer y después de una nueva vacunación con BCG (última barra desde la izquierda, línea punteada).

Figura 6. Expresión de IL-7, CD127 y TLSP en pacientes con EII

Se midieron los niveles de expresión de ARNm de IL-7, CD127 (forma soluble de IL-7R α) y TSLP (longitud completa) de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 7 en muestras de tejidos de sujetos sanos de control (control sin EII), muestras de biopsias de colon tomadas de sujetos sanos y enfermos (inflamación) que padecen colitis ulcerativa (CU) activa que no respondieron (o dejaron de responder) al tratamiento antiinflamatorio y en muestras de pacientes de CU con enfermedad quiescente, es decir, que se curaron o estaban en remisión al momento del muestreo (respondedores). El eje vertical representa las unidades de fluorescencia relativa. El valor se representa gráficamente para cada muestra en un grupo dado, la barra horizontal representa el promedio de los valores para el grupo y las barras de error representan la desviación estándar. “*” denota un valor $p < 0,05$; “**” un valor $p < 0,01$; “****” un valor $p < 0,0001$.

Figura 7. Inhibición de las vías de señalización de CD127

Se evaluó el efecto de varios anticuerpos CD127 humanos sobre la activación de vías de señalización mediante Western Blot como se detalla en el Ejemplo 8. La figura representa resultados representativos de 6 donantes diferentes. “Sin IL-7” corresponde a una muestra que no fue estimulada por la IL-7. “C” corresponde a una muestra de control, estimulada con IL-7 en ausencia del anticuerpo anti-CD127. Las líneas horizontales a la izquierda de la mancha representan la migración del marcador de peso molecular indicado. Las flechas a la derecha de la mancha indican la migración de STAT5 tirosina fosforilada, PI3-k p55 tirosina 199 fosforilada, Akt fosforilada, ERK 1/2 fosforilada y, como una referencia de carga, GAPDH.

Figura 8. Extinción de la liberación de citoquinas de células T de las biopsias de CU

Panel A. Producción de IFN γ mediante muestras de biopsias de CU cultivadas *ex vivo*. Panel B. Producción de IFN γ por muestras de biopsia de EC cultivadas *ex vivo*.

En ambos paneles, las muestras fueron obtenidas y tratadas de la manera que se detalla en el Ejemplo 9. Cada símbolo representa una muestra de un paciente, cultivada con IgG (“Ctrl Ab”) o con el anticuerpo anti-CD127 (“aIL-7R α ”). Los símbolos conectados son muestras pareadas del mismo paciente. ** P<0,01 con ensayo de Wilcoxon para muestras pareadas. La producción de IFN γ fue significativamente inhibida por mAb anti-IL7R α . Se observaron resultados similares para las muestras de biopsias de EC.

Figura 9. mAb anti-IL-7R α de ser humano y señales agonistas

Se evaluó el efecto de diversos anticuerpos anti-CD127 humanos sobre la activación de vías de señalización de STAT5, PI3K y ERK por Western Blot, tal como se detalla en el Ejemplo 11. La figura 9A muestra una de las siete diferentes células donantes en ausencia de IL7 humana recombinante exógena.

Panel A. “Medio” corresponde a una muestra sin ningún anticuerpo anti-CD127 humano. “Sin IL7” significa que ninguna de las cuatro muestras fue estimulada con IL-7. Tres muestras se trataron previamente con 10 μ g/mL de un mAb anti-IL-7R α (N13B2-hVL6 o MD707-13-G4 o 1A11-G1).

Panel B. Cuantificación de pI3K y pERK corregida a la expresión de GAPDH y normalizada a condiciones de control del medio (n = 7 donantes diferentes). El eje vertical representa la expresión normalizada al control. El valor se representa gráficamente para cada muestra en un grupo individual, la barra horizontal representa el valor promedio para el grupo y las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 10. Efecto de los mAb anti-IL7-R α humanos en la activación de la vía de IL7

La cuantificación de la señal fosfo-STAT5 fue corregida a la expresión de GAPDH y normalizada en condiciones de control medias. Las PBMC fueron pretratadas con 10 μ g/mL de un mAb anti-IL7-R α (N13B2-hVL6 o MD707-13-G4 o 1A11) y se incubaron durante 10 minutos a 37°C con 5 ng/mL de IL7 humana. Las cuantificaciones de la señal fosfo-STAT5 se corrigieron a la expresión de GAPDH (n = 7 donantes diferentes). La línea punteada representa la condición con medio solamente, sin tratamiento. El valor se representa gráficamente para cada muestra en un grupo individual, la barra horizontal representa el valor promedio para el grupo y las barras de error representan la desviación estándar. “*” denota un valor p < 0,05 entre los grupos indicados.

Figura 11. mAbs anti-IL7-R α duales agonista/antagonista inducen modificaciones transcripcionales

Análisis de secuencias de ARN de PBMC humanas (n = 7) incubadas durante 3,5 horas (1) con 5 ng/ml de IL7 humana, (2) sin IL7, (3,4,5) con 5 ng/mL de IL7 humana y diferentes mAb anti-IL7-R α humana ((3): 10 μ g/mL de N13B2-hVL6; (4): 10 μ g/mL de MD707-13-Ig4; (5): 10 μ g/mL de 1A11).

Panel A. Mapa de calor de la expresión de los 93 genes expresados de manera más diferencial (tasa de detección de falsos (FDR, *por sus siglas en inglés*) 5%, número de veces del cambio (FD, *por sus siglas en inglés*) > 2) entre la estimulación de IL7 y las condiciones de control.

Panel B. Cuantificación del perfil medio de los tres clústeres inducida por IL7 en condiciones de estimulación con IL7, de control e IL7 y mAb anti-IL7-R α humano.

Panel C. Diagrama de Venn de análisis de secuencias de ARN de PBMC humanas (n = 7) que se incubaron sin IL-7 durante 3,5 horas con diferentes mAb anti-IL-7R α humano (10 μ g/mL de N13B2-hVL6, 10 μ g/mL de MD707-13-Ig4 #1 o 10 μ g/mL de 1A11). Diagrama de Venn de los 481 genes expresados diferencialmente (FDR 5%, FC > 1,5) en comparación con mAb anti-IL-7R α humanos y condiciones de control con medio. El tamaño del círculo es proporcional al número de genes para cada categoría.

Ejemplos

Ejemplo 1. Humanización de cadenas livianas

La siguiente cadena pesada se utilizó en todos los experimentos informados en la presente, salvo que se indique de otro modo.

N13B2 humanizado_VH, secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 13):

```
CAGGTGCAGCTGGTCGAATCAGGGGGGGGACTGGTCAAACCCGGGGGCTCACTGCGTCTGTCATGT
GCCGTCTCAGGCTTCACACTGAGCGACTACTATATGGCATGGATCCGACAGGCACCAGGCAAGGGAC
TGGAGTGGGTGTCTACTATTTCTGCCAGTGGCCTGAGGACCTACTATCCTGACAGTGTCAAGGGAAG
GTTCACAATCTCACGGGATAACGCTAAAAATTCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAA
GACACCGCTGTGTACTATTGCGCTCGCCCACTGTCCGCACACTATGGCTTCAATTACTTTGATTATTG
GGGGCAGGGTACCCTGGTGACAGTCTCCAGC
```

N13B2 humanizado_VH humanizado, secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7): véase la Figura 1A

Las siguientes secuencias de nucleótidos optimizadas fueron utilizadas para la producción de las cadenas livianas de anticuerpos (cuyas secuencias de aminoácidos se proveen en la Figura 1B):

N13B2-h3 (SEQ ID NO: 14):

GAGATCGTCATGACGCAGTCCCCCGCAACGCTCTCCGTCTCCCCGGGGGAACGCGC
GACCCTGTCTGTCAGGACCTCCGAGGACATCTACCAAGGCCTCGCGTGGTATCAGC
AGAAGCCCGGCCAGGCCCCGCGGCTGTTGATCTACTCCGCGAACACCTTGACATC
GGCATCCCCGGCGCGCTTCTCGGGGTCAGGGAGCGGCACCGAGTTCACCCTGACCAT
CTCGTCGCTCCAGAGCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACTACGACT
ACCCCTGGCGTTTCGGGGGCGGGACCAAGGTGGAGATCAAG

N13B2hVL3 (SEQ ID NO: 15):

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCGAGCCTGAGTGCGAGTGTGGGCGACCGCGT
GACGATCACCTGCCGGACGTCCGAGGATATCTACCAGGGCCTCGCCTGGTACCAGC
AGAAGCCGGGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGCTGGTCTACAGCGCGAACACCCCTCCACATC
GGCGTCCCCAGCCGGTTCAGCGGCTCCGGCTCGGGAACGGACTACACCCTCACGAT
CTCGTCCCTGCAGCCGGAAGACTTCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGTATTACGACTA
CCCGCTGGCGTTTCGGTGGCGGCACCAAGGTTCGAGATCAAG

N13B2hVL4 (SEQ ID NO: 16):

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCGAGCCTGAGTGCGAGTGTGGGCGACCGCGT
GACGATCACCTGCCGGACGTCCGAGGATATCTACCAGGGCCTCGCCTGGTACCAGC
AGAAGCCGGGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGCTGGTCTACAGCGCGAACACCCCTCCACATC
GGCGTCCCCAGCCGGTTCAGCGGCTCCGGCTCGGGAACGGACTACACCCTCACGAT
CTCGTCCCTGCAGCCGGAAGACTTCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGTATTACGACTA
CCCGCTGGCGTTTCGGTGGCGGCACCAAGGTTCGAGATCAAG

N13B2hVL5 (SEQ ID NO: 17):

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCGAGCCTGAGTGCGAGTGTGGGCGACCGCGT
GACGATCACCTGCCGGACGTCCGAGGATATCTACCAGGGCCTCGCCTGGTACCAGC
AGAAGCCGGGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGCTGGTCTACAGCGCGAACACCCCTCCACATC
GGCGTCCCCAGCCGGTTCAGCGGCTCCGGCTCGGGAACGGACTACACCCTCACGAT
CTCGTCCCTGCAGCCGGAAGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTATTACGACT
ACCCGCTGGCGTTTCGGTGGCGGCACCAAGGTTCGAGATCAAG

N13B2hVL6 (SEQ ID NO: 18):

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCGAGCCTGAGTGCGAGTGTGGGCGACCGCGT
GACGATCACCTGCCGGACGTCCGAGGATATCTACCAGGGCCTCGCCTGGTACCAGC
AGAAGCCGGGGCAAGGCCCCCAAAGTCTGCTGGTCTACAGCGCGAACACCCCTCCACATC
GGCGTCCCCAGCCGGTTCAGCGGCTCCGGCTCGGGAACGGACTACACCCTCACGAT

CTCGTCCCTGCAGCCGGAAGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTATTACGACT
ACCCGCTGGCGTTCGGTGGCGGCACCAAGGTCGAGATCAAG

Cada secuencia del VL fue obtenida por síntesis génica, insertada en un vector de clonación (pUC57) con extremidades 5' y 3' de BsiWI y la adición de una secuencia Kozak (GCCACC) antes de ATG. Como vector de expresión, se utilizó plásmido de expresión pFuseCLIg-hk (Invivogen), que contenía el dominio constante CLkappa de la IgG1 humana.

Cada plásmido de clonación (VL-pUC57-Genscript) fue digerido con la enzima de restricción BsiWI para extraer el inserto VL (400 pb). El inserto purificado fue ligado en el plásmido de expresión pFuseCLIg-hk linealizado por digestión con BsiWI y desfosforilado. Los clones positivos, que tienen fragmentos de VL insertados en la orientación correcta antes de los dominios constante humanos, fueron amplificados y purificados por Midiprep libre de endotoxinas (Macherey-Nagel) para la etapa de transfección. La cadena pesada fue clonada de una manera similar, con el dominio constante consistente en la SEQ ID NO: 26.

Ejemplo 2. **Producción de cadenas livianas humanizadas**

Para los anticuerpos anti-CD127 humanizados ensayados, la transfección y la selección de clones estables fueron realizadas de acuerdo con los métodos convencionales. Tres sobrenadantes para cada anticuerpo correspondiente a diferentes relaciones de transfección de la cadena pesada (HC, *por sus siglas en inglés*) y la cadena liviana (LC, *por sus siglas en inglés*) se prepararon y sometieron a ensayo: 2:1, 1:1,3, y 1:2 de HC:LC. Los títulos obtenidos se informan en la Figura 2, obtenida a continuación de la producción en células CHO sembradas en un nivel de 300.000 células/mL; sin antibióticos, de acuerdo con métodos convencionales: el título se sometió a ensayo ELISA en anti-IgG humano (Fc) inmovilizado del anticuerpo correspondiente y la revelación fue realizada con un mAb de ratón anti-kappa humana más anticuerpos de asno anti-ratón marcados con peroxidasa y se revelaron por colorimetría a 450 nm utilizando sustrato TMB.

La producción de N13B2-h3 y N13B2-hVL6 también se ensayó en experimentos de transfección transitoria. Un día antes de la transfección, se sembraron células COS a 100.000 células/pocillo en una placa P12 con medio completo (DMEM SVF al 10% (Hyclone) + PS al 1% + Glu al 1%) y se incubaron a 37°C, en 5% de CO₂. El día de la transfección, las células COS fueron utilizadas a 50 a 90% de confluencia. Se lavaron con PBS y se mantuvieron con 500 µl de medio completo. Se mezclaron 0,6 µg de la variante VH + 0,4 µg de la variante VL en 200 µl de medio OptiMEM y se agregó 1 µl de reactivo Plus (Invitrogen) (15 minutos de

incubación a temperatura ambiente). Se agregaron en la mezcla 3,5 µl de lipofectamina LTX (Invitrogen) + 100 µl y se incubaron durante 25 minutos a temperatura ambiente. Toda la mezcla se depositó gota a gota sobre células COS y se incubó 48 horas a 37°C, en 5% de CO₂. Después de 48 horas, se cosecharon los sobrenadantes y se centrifugaron (1500 rpm; 10 minutos; 4°C). Se cuantificaron los sobrenadantes con ELISA #TH-MO-43. El ensayo de actividad se realizó con ELISA TH-MO-44.

Ejemplo 3. Unión a CD127 - ELISA

Para ELISA sándwich, se recubrió una placa de 96 pocillos con anticuerpo de asno anti-IgG humana (Fc-específica) a 1,2 µg/ml y se agregaron anticuerpos purificados para medir la concentración en función de un rango estándar. Después de la incubación y el lavado, se agregaron anticuerpo de cadena liviana de ratón anti-humano, kappa-específico (Effimune, clon NaM76-5F3) más anticuerpo de asno anti-ratón marcado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch, referencia 715-036-151) y se revelaron por métodos convencionales.

Para el ensayo de actividad ELISA se inmovilizó hCD127 recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H08H) sobre plástico a 1 µg/ml, y se agregaron las diluciones del anticuerpo anti-CD127 para medir la unión. Después de incubación y lavado, se agregó el anticuerpo de cadena liviana de ratón anti-humano (kappa-específico) más anticuerpo de asno anti-ratón marcado con peroxidasa, y se revelaron por colorimetría a 450 nm utilizando sustrato TMB por métodos convencionales.

Se obtuvieron los siguientes valores de ED50 (concentración requerida para alcanzar el 50% de la señal máxima):

	ED50 (ng/ml)
N13B2-h3	16,8
N13B2-hVL3	15,1
N13B2-hVL4	12,6
N13B2-hVL5	14,8
N13B2-hVL6	9,5

Tabla 1. Valor de ED50 (en ng/ml) para la unión de los anticuerpos a CD127

Se estudió la estabilidad de los anticuerpos incubando los anticuerpos durante 7, 14 o 30 días a 4°C, 25°C y 42°C. La unión de los anticuerpos a CD127 siguió siendo excelente incluso

después de la incubación durante 30 días. Se informan en la Tabla 2 los valores de ED50 determinados por ELISA después de 30 días de incubación.

	ED50 (ng/ml)
N13B2-hVL6 d7 a 4°C	55,31
N13B2-hVL6 d7 a 25°C	47,83
N13B2-hVL6 d7 a 42°C	56,16
N13B2-hVL6 d14 a 4°C	62,75
N13B2-hVL6 d14 a 25°C	52,58
N13B2-hVL6 d14 a 42°C	40,62
N13B2-hVL6 d30 a 4°C	46,98
N13B2-hVL6 d30 a 25°C	40,19
N13B2-hVL6 d30 a 42°C	58,69

Tabla 2: Valor de ED50 (en ng/ml) respecto de la unión de los anticuerpos a CD127 después de 30 días de incubación a la temperatura indicada.

Ejemplo 4. Unión a CD127 - Blitz

Este método se realiza con un Blitz (Forté Bio, C22-2 NO 61010-1).

hCD127 recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H08H)/proteína recombinante (Sino Biological Cat: 11612-H08H) se inmovilizó a 50 µg/ml por fragmento Fc en biosensor (AHC) para Fc anti-IgG humana (Forté Bio, 18-5063) durante 30 segundos. Se agregaron los anticuerpos anti-CD127 a 20 µg/mL (saturando la concentración) durante un período de asociación de 120 segundos, seguido por un período de disociación del anticuerpo anti-CD127 en buffer cinético durante 120 segundos. El análisis de los datos se realizó con el software Blitz pro 1.2, que calculó la constante de asociación (k_a) y la constante de disociación (k_d), y determinó la constante de afinidad KD (k_a/k_d). Los resultados se presentan en la Tabla 3.

	Asociación (k_a) (1/Ms)	Disociación (k_d) (1/s)	Afinidad (KD) (M)
N13B2-h3	1,15e6	2,67e-3	2,33e-9
N13B2-hVL3	1,27e6	4,47e-3	3,51e-9
N13B2-hVL4	1,04e6	2,81e-3	2,71e-9
N13B2-hVL5	1,01e6	2,66e-3	2,63e-9

N13B2-hVL6	1,05e6	2,66e-3	2,53e-9
-------------------	--------	---------	----------------

Tabla 3: *Análisis de afinidad por Blitz de anticuerpos anti-CD127 sobre proteína recombinante CD127 humana.*

Ejemplo 5. **Inhibición de la fosforilación de STAT5**

Para ensayar la inhibición del IL7R en el ensayo funcional, se incubó el anticuerpo con PBMC humanas durante 30 minutos a 37°C, antes de estimular con IL7 (AbD Serotec, ref. PHP046) a 0,1 ng/ml durante 15 minutos a 37°C. La reacción fue detenida a 4°C y lavada con buffer Perm Wash antes de fijación con el kit Cytotfix/Cytoperm (BD Bioscience, ref. 554722) durante 15 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas y teñidas con anti-CD3 marcado con FITC (BD Bioscience, ref. 557694) durante 30 minutos a 4°C. Luego, las células se permeabilizaron en buffer Perm Buffer III para incubación (BD Bioscience, ref. 558050) durante 30 minutos a 4°C. Después de lavar con PBS BSA al 1% y azida al 0,1%, las células fueron teñidas con el anticuerpo anti-pStat5 Alexa-647 (BD Bioscience, ref. 612599) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas en un citofluorómetro BD CantoII. hPBMC-CD3+ con IL7 indujo la fosforilación de pStat5, mientras que, sin IL7, no hubo fosforilación. Se informan los resultados en la Figura 4 y en la tabla a continuación, donde se presenta la ED50, es decir, la concentración de los anticuerpos indicados para alcanzar el 50% de la señal en este ensayo.

	IC50-MFI (ng/ml)
N13B2-h3	21,5
N13B2-hVL3	27,2
N13B2-hVL4	16,1
N13B2-hVL5	27,3
N13B2-hVL6	16,8

Tabla 4: *Inhibición de la fosforilación de STAT5 por anticuerpos anti-CD127.*

Este experimento confirmó que la modificación de la línea germinal y la modificación de residuos estructurales por aminoácidos humanizados no cambió la actividad biológica del anticuerpo anti-CD127. Todas las variantes sometidas a prueba (N13B2-h3, N13B2-hVL3, N13B2-hVL4, N13B2-hVL5, N13B2-hVL6) pudieron inhibir la fosforilación de STAT5 después de la estimulación de IL7 en hPBMC, como lotes de referencia producidos anteriormente de N13B2. Enfocándose en N13B2-hVL6 (el más humanizado y más

optimizado), se advirtió que era posible mantener su actividad biológica para inhibir la fosforilación de STAT5, en la misma medida que N13B2-h3 de referencia. Además, esta variante resultó muy estable tras 14 días de incubación a 42°C, 25°C o 4°C, no indujo la formación de agregados, y mantuvo su actividad de unión.

Ejemplo 6. **Efecto sobre las células T de memoria**

Modelo de hipersensibilidad de tipo retardado inducida por tuberculina.

Se inmunizaron babuinos por vía intradérmica dos veces con una vacuna del bacilo de Calmette-Guerin (0,1 ml; 2-8 105 UFC; Sanofi Pasteur MSD, Lyon, Francia) en la zona superior de la pierna, 4 y 2 semanas antes del ensayo en piel de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH, *por sus siglas en inglés*). Se realizaron reacciones intradérmicas (IDR, *por sus siglas en inglés*) con inyecciones intradérmicas de 2000 o 1000 UI de derivado proteico de tuberculina purificado (PPD; Symbiotics Corporation, San Diego, California). Se utilizó solución salina (0,1 ml) como control negativo. Las respuestas dérmicas en los sitios de inyección se midieron usando un calibre ajustable mediante al menos dos observadores y se consideraron positivas cuando el diámetro era > 4 mm. Se realizó una segunda IDR después de un periodo de lavado de tres semanas y los animales recibieron una inyección intravenosa de 10 mg/kg de N13B2 (n = 7) o 10 mg/kg (V915GA, AA892BB, 32257, 33874) (n = 4) de N13B2 humanizado o equivalente del volumen de excipiente (n = 4). Se realizaron IDR adicionales cada mes después de la inyección. Después de un período de lavado, algunos babuinos (previamente tratados con N13B2) fueron inmunizados nuevamente dos veces con BCG por vía intradérmica después de una nueva IDR. El promedio de la lectura fue registrado y graficado para cada punto de tiempo. Para comparar varias condiciones experimentales, se cuantificaron las respuestas de eritema como el área bajo la curva (AUC, *por sus siglas en inglés*) utilizando el software Graph PAD Prism para el cálculo (Figura 5A y B).

Elispot.

La frecuencia de células T específicas para Ag fue seguida con un ensayo ELISPOT de IFN-g (kit de ensayo ELISPOT de IFN-g en primate no humano; R&D Systems, Minneapolis, MN) sobre PBMC recientemente aisladas reestimuladas con tuberculina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Brevemente, el anticuerpo de captura (R&D Systems, número de catálogo SEL961) fue añadido a cada uno de los pocillos de una placa filtrante Elispot MultiScreen® HTS (Merck Millipore) y se incubó durante una noche a 4°C. Después de tres lavados, se agregó buffer de bloqueo y la placa se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se extrajeron PBMC de babuinos a partir de

sangre de los mismos por centrifugación en gradiente de Ficoll (GE Healthcare Life Science, París, Francia). Seguidamente, se lisaron glóbulos rojos y las células se lavaron antes de su reconstitución en una concentración adecuada en medios de cultivo (medio TexMacs suplementado con penicilina-estreptomicina (Gibco) con o sin derivado proteico de tuberculina purificado. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 18-24 horas. Después de tres lavados con buffer de lavado, se agregó anticuerpo de detección (R&D Systems, número de catálogo SEL961) y se incubó a 4°C durante 24 horas. Se agregó estreptavidina-AP (R&D Systems, número de catálogo SEL002) después de tres lavados y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Se realizaron tres lavados. Se agregó BCIP/NBT (R&D Systems, número de catálogo SEL002) y se puso en la oscuridad durante 30 minutos. Fueron necesarios varios lavados con buffer de lavado y uno con agua desionizada (Figura 5C).

Animales

Los babuinos (*Papio anubis*; 7-14 kg) fueron suministrados por el Centro de Primatología del Centre National de la Recherche Scientifique Centre de Primatologie - Rousset, Francia. Los animales fueron alojados en las instalaciones para grandes animales de la unidad 1064 de INSERM. Los estudios en animales fueron aprobados por el Comité Nacional de Ética Francés.

Resultados

En un primer experimento, se realizó una primera IDR con tuberculina en babuinos vacunados con BCG que no recibieron tratamiento en ese momento (día 30). Después de un período de lavado de un mes, se realizó una segunda IDR a las 4 horas y cada mes después de inyección intravenosa de 10 mg/kg de N13B2 (barras blancas). Una última IDR se realizó después de una nueva vacunación con BCG (14 meses pos-inyección de anticuerpos). Los animales de control (barras negras) recibieron un volumen similar de excipiente intravenoso y fueron desafiados con el mismo protocolo. Los resultados mostraron que los anticuerpos quiméricos anti-IL7-R α indujeron una protección muy a largo plazo (hasta 14 meses) después de una única administración. La respuesta se recuperó sólo después de la nueva vacunación.

En otro experimento, una primera IDR con tuberculina se realizó en babuinos vacunados con BCG (barras punteadas - por ejemplo, IDR1 para V915GA). Después de un período de lavado de un mes, se realizó una segunda IDR 4 h y cada mes después de inyección intravenosa de 10 mg/kg de N13B2 humanizado (barras sólidas, por ejemplo, IDR2-6 para V915GA). Una última IDR se realizó después de una nueva vacunación con BCG y tuberculina (barras punteadas - por ejemplo, IDR7 para V915GA). Los animales de control (barras negras) recibieron un volumen similar de excipiente intravenoso y fueron desafiados con el mismo protocolo. Los resultados

mostraron que N13B2 humanizado también indujo una protección a largo plazo después de una única administración en 3 de 4 babuinos evaluados. El animal “33874” fue inicialmente respondedor inmediatamente después de la inyección de anticuerpos, pero la respuesta se recuperó espontáneamente un mes más tarde.

Las PBMC de sangre se volvieron a estimular *ex vivo* con tuberculina. Un primer Elispot de IFN γ con o sin tuberculina fue realizado en babuinos vacunados con BCG (barras punteadas). Un segundo Elispot de IFN γ fue realizado 4 días después de la inyección con 10 mg/kg de N13B2 humanizado (barras completas). Se realizó otro Elispot todos los meses en cada nueva IDR con tuberculina *in vivo*. Se realizó un último Elispot de IFN γ después de la nueva vacunación con BCG (barras punteadas). Los resultados mostraron que la administración de N13B2 humanizado indujo la eliminación de células T de memoria específicas de antígeno en animales respondedores en el largo plazo. El babuino “33874” no mostró una reducción significativa de células T de memoria específicas de tuberculina en paralelo sin protección a largo plazo en el modelo DTH. Después de una nueva vacunación con BCG, los animales respondedores a largo plazo mostraron una mayor frecuencia de células T de memoria específicas de antígeno que se recuperan al nivel basal (antes de la inyección del mAb) y esto está asociado con la recuperación de la respuesta de DTH *in vivo*. En conjunto, estos resultados demuestran que la protección a largo plazo inducida por N13B2 humanizado se asocia con la eliminación de células T de memoria específicas de antígeno que explican el efecto a largo plazo de la droga.

Ejemplo 7. **Expresión de IL-7, CD127 y TLSP en pacientes con EII**

Los datos en bruto de la expresión de ARNm según se detallan en Planell *et al.*, Gut, 2013, fueron analizados como se detalla en la leyenda de la Figura 6.

Ejemplo 8. **Vía de señalización de PBMC humanas estimuladas con anticuerpos anti-CD127 más IL7**

Se estudiaron las vías de señalización de IL7 a partir de lisados de PBMC humanas incubadas durante 30 minutos a 37°C con 10 μ g/ml de anticuerpos solubles anti-CD127 humano y estimulados con IL7 (AbD Serotec, ref. PHP046) a 5 ng/ml durante 10 minutos a 37°C. Se realizó Western Blot en condiciones reductoras con 20 μ g de proteína de lisados celulares en geles de poliacrilamida al 7,5% y se mancharon sobre membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare). Las manchas se saturaron con BSA-Tris buffer salino (TBS) al 5% y se revelaron con anticuerpos Phospho-Stat5, Phospho-PI3-Kinase p85, Phospho-Akt y Phospho-ERK1/2 (Cell Signalling Technology) a 1/1000 en BSA-TBS al 1% (toda la noche a 4°C) seguido de

anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (Cell Signalling Technology) a 1/2000 durante 1 hora a temperatura ambiente o con anticuerpo GAPDH (Santa Cruz) a 1/1000 en BSA-TBS al 1% (toda la noche a 4°C), seguido de anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch) a 1/2000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando el sistema de imágenes LAS-3000 (Fujifilm). Se sometieron a ensayo los siguientes anticuerpos anti-CD127: N13B2-h3 y N13B2-hVL6 (ambos anticuerpos anti-sitio 1/2b, divulgados en la presente); MD707-13-G4 (“anticuerpo anti-sitio1”, que se divulga en la solicitud de patente internacional WO 2013/056984) y 1A11 (divulgada en la patente de GSK WO 2011/094259).

Ejemplo 9. Efecto sobre la liberación de citoquinas de células T en el tejido de EII

Pueden utilizarse biopsias de pacientes con EII como un modelo inflamatorio de enfermedad *ex vivo* y en la presente han demostrado liberar espontáneamente niveles elevados de citoquinas proinflamatorias después de 24 horas de cultivo (CU: IFN γ , 130 $\pm$ 19 pg/ml; IL-6, 4042 $\pm$ 529 pg/ml; IL-8, 25626 $\pm$ 1640 pg/ml – EC: IFN γ , 180 $\pm$ 38 pg/ml; IL-6, 3653 $\pm$ 734 pg/ml; IL-8, 15540 $\pm$ 2452 pg/ml [medias $\pm$ eem para CU y EC, respectivamente]).

Se aplicó mAb anti-CD127 a 10 μ g/ml en este ensayo de cultivo de órganos con el empleo de muestras quirúrgicas tomadas de la mucosa colónica inflamada de 20 pacientes con EII (10 con enfermedad de Crohn y 10 con colitis ulcerativa, y el cultivo se realizó a 37°C durante 24 horas en medio con 10 μ g/ml de mAb IgG de control o mAb anti-IL-7R α humano de bloqueo (ver los detalles de muestreo y condiciones de cultivo más abajo). Una muestra de control emparejada de cada paciente fue muestreada y cultivada en las mismas condiciones, con control de IgG en lugar de anticuerpo anti-CD127. Se midió la concentración de citoquinas por ELISA (tal como se detalla a continuación) en el sobrenadante de las muestras cultivadas *ex vivo*.

La producción de IFN γ mediante muestras de biopsias de CU cultivadas *ex vivo* fue significativamente inhibida por mAb anti-IL7R α . Se observaron resultados similares para algunas de las muestras de biopsias de EC que secretan altas cantidades de IFN γ .

Muestreo y cultivo de órganos ex vivo

Si se utilizó el tejido de resección mucosal, se cortaron fragmentos de tamaño pequeño con el empleo de tijeras. A continuación, se colocaron biopsias o fragmentos de tamaño de biopsia en 300 μ L de medio HL-1 libre de suero (Lonza, Cambridge, BioScience, Reino Unido) suplementado con L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina y

50 µg/mL de gentamicina. Los explantes de mucosa fueron incubados durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. El anticuerpo respectivo que se sometió a ensayo (N13B2) o control de IgG utilizado a 10 µg/mL se agregó en el medio al comienzo del período de incubación. Por último, el sobrenadante y el material de biopsia fueron congelados instantáneamente y almacenados a -70°C para análisis futuros.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

La producción de citoquinas en el sobrenadante de la biopsia se midió mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Se utilizó IFN-γ humano recombinante de ImmunoTools (31673539, Friesoythe, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 10. Comparación de anticuerpos anti-IL7Rα humano en relación con la caracterización de sus epítopes

Análisis de espectrometría de masa: perfilado de anticuerpos con el empleo de microarreglo de péptidos.

Los microarreglos de péptidos PepStar™ comprenden péptidos sintéticos purificados derivados de antígenos o de otras fuentes que están quimioselectiva y covalentemente inmovilizados sobre una superficie de vidrio. Una fracción del enlazador hidrófilo optimizado se inserta entre la superficie del vidrio y la secuencia de péptidos derivados de antígenos para evitar resultados falsos negativos causados por impedimento estérico. Por razones técnicas, todos los péptidos contienen una glicina en el extremo C terminal. Se realizaron experimentos de generación de perfiles de muestras en una biblioteca de péptidos que consiste en 52 péptidos. La lista completa de los péptidos se consigna a continuación:

SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
44	ESGYAQNGDLEDAEL	62	FIETKKFLLIGKSNI	80	HDVAYRQEKDENKWT
45	AQNGDLEDAELDDYS	63	KKFLLIGKSNICVKV	81	YRQEKDENKWTHVNL
46	DLEDAELDDYSFSCY	64	LIGKSNICVKVGEKS	82	KDENKWTHVNLSTK
47	AELDDYSFSCYSQLE	65	SNICVKVGEKSLTCK	83	KWTHVNLSTKLTLL
48	DYSFSCYSQLEVNGS	66	VKVGEKSLTCKIDL	84	VNLSTKLTLLQRKL
49	SCYSQLEVNGSQHSL	67	EKSLTCKKIDLTIV	85	STKLTLLQRKLQPA

50	QLEVNGSQHSLTCAF	68	TCKKIDLTIVKPEA	86	TLLQRKLQPAAMYEI
51	NGSQHSLTCAFEDPD	69	IDLTIVKPEAPFDL	87	RKLQPAAMYIEIKVRS
52	HSLTCAFEDPDVNTT	70	TIVKPEAPFDLSVIY	88	PAAMYIEIKVRSIPDH
53	CAFEDPDVNTTNLEF	71	PEAPFDLSVIYREGA	89	YEIKVRSIPDHYFKG
54	DPDVNTTNLEFEICG	72	FDLSVIYREGANDFV	90	VRSIPDHYFKGFWSE
55	NTTNLEFEICGALVE	73	VIYREGANDFVVTFN	91	PDHYFKGFWSEWSPS
56	LEFEICGALVEVKCL	74	EGANDFVVTFNTHL	92	FKGFWSEWSPSYFR
57	ICGALVEVKCLNFRK	75	DFVVTFNTHLQKKY	93	WSEWSPSYFRTPEI
58	LVEVKCLNFRKLQEI	76	TFNTHLQKKYVKVL	94	SPSYFRTPEINNSS
59	KCLNFRKLQEIYFIE	77	SHLQKKYVKVLMHDV	95	YFRTPEINNSSGEMD
60	FRKLQEIYFIETKKF	78	KKYVKVLMHDVAYRQ		
61	QEIYFIETKKFLLIG	79	KVLMHDVAYRQEKDE		

Tabla 5: Lista de los péptidos utilizados en ensayos de microarreglo de péptidos.

Un total de 4 muestras fueron incubadas en un portaobjetos de microarreglo usando un formato multipocillos. Para el anticuerpo N13B2-h3VL6 y la otra muestra (MD707-13, HAL y 1A11), se aplicaron 6 diferentes concentraciones (10 µg/ml; 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,001 µg/ml). Las diluciones en serie de las muestras se incubaron durante 1 hora a 30°C en un portaobjetos de microarreglo multipocillo que contenía 21 miniarreglos individuales (1 miniarreglo por dilución de muestra). Tras la incubación de la muestra, se agregó un anticuerpo anti-IgG humana secundario a 1 µg/ml y se dejó reaccionar durante 1 hora. Se realizó una incubación de control adicional aplicando el anticuerpo secundario solamente, en paralelo en el mismo portaobjetos de microarreglo para evaluar la unión falsa positiva a los péptidos. Después del lavado y secado, el portaobjetos es escaneado con un escáner láser de alta resolución a 635 nm para obtener perfiles de intensidad de fluorescencia. Las imágenes resultantes fueron cuantificadas para producir un promedio de valor de píxel para cada péptido. Se cuantificaron las imágenes para producir una media de valor de píxel para cada péptido. El anticuerpo secundario anti-IgG humana se marcó con Cy5 a 1 µg/ml.

Buffers y soluciones.

Se utilizaron buffer TBS con Tween 20 al 0,05% (JPT) y buffer de ensayo T20 (Pierce, SuperBlock TBS T20, #37536). La adquisición y el análisis fueron realizados utilizando microarreglos de péptidos (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania; lote #2668, cámara de incubación Multi-Well, Axon Genepix Scanner 4200AL). Los microarreglos fueron escaneados utilizando un escáner de fluorescencia de alta resolución. Las configuraciones de láser y la resolución aplicada fueron idénticas para todas las mediciones realizadas. Las imágenes resultantes se analizaron y cuantificaron con el empleo del software de reconocimiento de puntos GenePix (Molecular Devices). Para cada punto, se extrajo el promedio de la intensidad de la señal (entre 0 y 65.535 unidades arbitrarias).

Para profundizar la evaluación de los datos, se determinaron los denominados valores MMC2. El MMC2 es igual al valor promedio de las tres instancias en el microarreglo, excepto cuando el coeficiente de variación (CV) -desviación estándar dividido por el valor promedio- es mayor que 0,5. En este caso, la media de los dos valores más cercanos (MC2) se asigna a MMC2.

Análisis de deuterio

Utilizando el sistema HDX-2 (Waters S.A./N.V.; Zellik, Bélgica), se mezclaron CD127 recombinante humano y 0 o 1 equivalente molar de mAb, y se diluyeron en 99,9% de D₂O, 10 mM de fosfato de sodio, 100 mM de NaCl, a pH 6,8 hasta un contenido final de D₂O del 90% y una concentración de CD127 o del complejo CD127/mAb de 27,5 µM. Se realizó intercambio de hidrógeno-deuterio a 20,0°C durante 30 minutos. El intercambio se apagó mediante una dilución 1:1 (v/v) de muestras con 100 mM de fosfato de sodio, 4 M de guanidina·HCl, 0,4 M de TCEP, a pH 2,3 a una temperatura de 1°C, lo cual da como resultado un pH final de 2,5. Después de 2 minutos, las muestras apagadas se cargaron en el HDX Manager para la digestión con pepsina en línea a 20,0°C (pepsina Enzymate BEH; 2,1 x 30 mm; 5 µm), seguida por la desalinización (Acquity BEH C18 Vanguard de 2,1 mm x 5 mm; 1,7 µm) y separación en fase inversa (Acquity BEH C18 de 1 mm x 100 mm; 1,7 µm) con un gradiente de 5%-40% de ácido fórmico al 0,2% en acetonitrilo (a pH 2,5) durante 10 minutos a un caudal de 40 µl/minuto a 0°C. Se realizó un análisis de espectrometría de masa con un espectrómetro Waters Xevo G2-XS ESI-Q-TOF en el modo de iones positivos, con corrección *lockspray*. Se utilizaron condiciones de fuente moderadas (temperatura: 90°C, voltaje capilar: 2,5 kV, cono de muestra: 30 V, flujo de gas de desolvatación: 800 L/h, temperatura de desolvatación: 250°C) para minimizar el retro-intercambio al tiempo que se asegura la desolvatación (73). La identificación de péptidos fue asistida por disociación inducida por colisión colectada en el modo MSE, utilizando PLGS 3.0.2 y UNIFI 1.8. La incorporación de deuterio se determinó en DynamX 3.0. Se confeccionaron figuras estructurales utilizando PyMOL 1.8.2.3 (Schrödinger

LLC, Cambridge, MA, EE. UU.) a partir de PDB ID 3DI3(19). Se adquirieron fosfato de sodio monobásico y dibásico, cloruro de sodio, clorhidrato de guanidina, clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), hidróxido de sodio al 50% y ácido fórmico a Sigma Aldrich (Schnelldorf, Alemania) con el mayor grado de pureza disponible. Los disolventes de grado LC-MS procedían de Biosolve Chimie (Dieuze, Francia), el óxido de deuterio (99,9% D) y cloruro de deuterio al 20% en óxido de deuterio (99,96% D) de Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, EE.UU.), el ácido clorhídrico al 37% de VWR International (Fontenay-sous-Bois, Francia) y el digesto de citocromo C bovino de Thermo Fisher Scientific (Germering, Alemania). Los filtros ultracentrífugos Amicon (0,5 mL; corte de 10 kDa) fueron suministrados por Merck Millipore (Molsheim, Francia).

Resultados

La caracterización de epítopes por arreglo de péptidos lineales de diferentes mAb anti-IL7R α identificó dos tipos de mAb antagonistas: (1) mAb que se unen a la región (sitio 1) de interacción con IL-7, como se ha descrito anteriormente por otros dos grupos (clon 1A11 descrito en WO 2011/094259 y clon HAL descrito en WO 2011/104687) e incluyendo MD707-13; y (2) un mAb, es decir, N13B2-h3VL6 de la presente invención, que se une al sitio 1 y un epítipo que se solapa con el dominio predicho (sitio 2b) de heterodimerización entre IL-7R α y las subunidades de la cadena γ (Walsh, 2012).

Se expresaron N13B2-h3VL6 y MD707-13 con afinidades altas y similares (el enlazador al sitio 1/2b con una KD de $2 \cdot 10^{-10}$ M y un enlazador al sitio 1 con una KD similar de $5 \cdot 10^{-10}$ M) de manera recombinante con un isotipo Fc de la IgG4 humana (que contiene una mutación de bisagra S228P para prevenir el intercambio Fab-brazo) y se comparó con otro mAb del sitio 1 previamente descrito con afinidad similar, clon 1A11, que se describe en la WO 2011/094259 (KD de $6 \cdot 10^{-10}$ M) y se expresa de manera recombinante con un isotipo Fc de la IgG1 humana como ha sido desarrollado en la clínica (NCT02293161). El análisis del epítipo conformacional utilizando intercambio de hidrógeno y deuterio con espectrometría de masa (HDX-MS) confirmó observaciones anteriores y demostró que el anticuerpo de la invención, es decir, N13B2-h3VL6 (mAb sitio 1/2b), protegido de la incorporación de deuterio en varios péptidos del sitio 1, pero también a un péptido que solapa el sitio 2b, mientras que los otros dos mAb (MD707-13 y 1A11) significativamente impiden la incorporación de deuterio sólo en péptidos del sitio 1 (los datos no se muestran).

El anticuerpo de la invención fue el único en reconocer un epítipo conformacional localizado en el sitio 1 del dominio 1 y un epítipo conformacional localizado en el sitio 2b de CD127 humano.

Ejemplo 11. Comparación de anticuerpos anti-IL-7R α humano por su capacidad para ser agonistas o antagonistas de la vía de IL-7

Western Blot

PBMC humanas recién aisladas fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C con 10 μ g/ml de mAb anti-IL-7R α , y después se cultivaron solas o con 5 ng/ml de IL-7 recombinante humana (AbDSerotec) durante 10 minutos a 37°C. Después de detener las reacciones en hielo, se prepararon lisados celulares con buffer RIPA (con cóctel inhibidor de proteasas). Se resolvieron las proteínas (15 μ g) en condiciones reductoras en 7,5% de geles de poliacrilamida y se inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare) utilizando métodos estándar. Las manchas se lavaron con BSA-Tris buffer salina al 5% y se incubaron con anticuerpos específicos Phospho-STAT 5, Phospho-PI3K p55 o Phospho-ERK en BSA-TBS al 1% (durante la noche a 4°C), seguido por un anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa de rábano picante (Cell Signalling Technology) durante 1 hora a temperatura ambiente. Alternativamente, las manchas se tiñeron utilizando un anticuerpo GAPDH (Santa Cruz) en BSA-TBS al 1% (durante la noche a 4°C), seguido de anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immunoresearch) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando el sistema de imágenes LAS-3000 (Fujifilm).

Secuenciamiento de ARN

Se incubaron PBMC humanas recién aisladas durante 30 minutos a 37°C con 10 μ g/ml de mAb anti-IL-7R α humano, y después se cultivaron solas o con 5 ng/ml de IL-7 recombinante humana (AbDSerotec) durante 3 horas a 37°C. Se detuvieron las reacciones en hielo y los pellets celulares se resuspendieron en buffer RLT (Qiagen) que contenía 1% de β -mercaptoetanol en RNasa/DNasa libre de agua y almacenada a -80°C. El ARN se extrajo usando un mini kit de extracción de ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). La calidad y la cantidad de ARN se evaluaron mediante espectrometría infrarroja (Nanodrop) y bioanalizador Agilent (kit Agilent RNA 6000 Pico). Broad Technology Labs preparó bibliotecas Smart-Seq2 y se secuenciaron con Broad Genomics Platform según el protocolo SmartSeq2 con algunas modificaciones. Brevemente, el ARN total se purificó usando perlas RNA-SPRI, poliA +

ARNm se transcribió en forma inversa a ADNc, y ADNc amplificado fue sometido a fragmentación basada en transposón que utilizó doble indexación para codificar por barras cada fragmento de cada transcripto convertido con una combinación de códigos de barras específicos para cada muestra. La secuenciación se llevó a cabo como extremos apareados 2x25bp con 8 ciclos adicionales para cada índice. Los datos se separaron por código de barras y se alinearon utilizando Tophat versión 2.0.10 con la configuración predeterminada. Los transcriptos se cuantificaron mediante Broad Technology Labs Computational Pipeline con Cuffquant versión 2.2.1. Brevemente, los datos se procesaron mediante CuffNorm si el 50% de las lecturas estaban alineadas, y si se alinearon al menos 100.000 pares por muestra. La normalización utilizó la configuración predeterminada, incluyendo la normalización “geométrica”, y se utilizó la información del nivel de expresión como valores logarítmicos 2 transformados FPKM (fragmentos por kilobase de transcripto por millones de fragmentos mapeados) para su posterior análisis. Para la identificación de genes diferenciales, se realizó el modelado lineal con estimación de la relación media-varianza (*limma-trend*) con procedimiento estadístico empírico de Bayes utilizando el paquete *limma* en R. Genes con valor ajustado de Benjamini y Hochberg $p < 5\%$ y el número de veces de cambio (FC) $> 1,5$ se consideraron como expresadas diferencialmente. Para la representación de la expresión génica, se realizaron análisis de componentes principales (PCA, *por sus siglas en inglés*) y la formación de clústeres en R v3.3.2 usando los paquetes *ade4/adegraphics* y *pheatmap* respectivamente. La importancia biológica de los genes seleccionados se evaluó mediante el uso del paquete R *clusterProfiler*. Se seleccionaron las categorías de ontología génica (GO, *por sus siglas en inglés*) con una tasa de detección de falsos (FDR, *por sus siglas en inglés*) $< 5\%$ y con un mínimo de cinco genes representados. Los datos RNA-Seq pueden consultarse en GEO con el número de acceso GSE.

Resultados

Vías de señalización de STAT5, PI3K y ERK

Se compararon mAb anti-IL-7R α humano (N13B2-h3VL6, MD707-13, 1A11 y HAL) por su capacidad para activar o bloquear las vías de señalización STAT5, PI3K y ERK asociadas previamente con la señalización IL-7R (Figuras 9 y 10). Como se ilustró anteriormente (véase, por ejemplo, Figura 7), la IL-7 induce potente fosforilación de STAT5 en PBMC humanas y todos los mAb ensayados son potentes inhibidores de esta fosforilación de STAT5 (véase la figura 7). Por el contrario, y como se ilustra en las Figuras 9 y 10, los inventores hallaron que mientras que la IL-7 induce una fosforilación de PI3K variable y no induce la fosforilación de ERK, los anticuerpos de la técnica anterior (a saber, MD707-13, 1A11 y HAL) inducen significativamente la fosforilación de ERK y, en menor medida, la señal PI3K incluso en

ausencia de IL-7 exógena, al contrario del anticuerpo de acuerdo a la invención. Estos hallazgos muestran que los anticuerpos anti-IL-7R α humano de la técnica anterior tienen propiedades agonistas parciales y, por lo tanto, se consideran como mAb dual agonista/antagonista para IL-7R humano. Por el contrario, un anticuerpo de acuerdo con la invención y, en particular, N13B2-h3VL6, solo tiene propiedad antagonista para IL-7R humano.

Los inventores evaluaron si los anticuerpos con propiedades agonistas/antagonistas podrían suministrar una señal agonista eficaz con capacidad de modificar las células T humanas. Se analizaron los transcriptomas de PBMC humanas incubados durante 3,5 horas sin IL-7 humana exógena, con IL-7 humana, y con IL-7 y un anticuerpo (MD707-13, 1A11 sitio 1 (IgG4 # 1 o IgG1 # 2, respectivamente) o N13B2-hVL6 sitio-1/2B (IgG4)) por secuenciamiento de siguiente generación basado en ARN (RNA-SEQ). Un total de 481 genes fueron expresados diferencialmente en PBMC humanas incubadas con mAb anti-IL-7R α humano en comparación con las condiciones de control, mientras que un total de 334 genes fueron expresados diferencialmente con estimulación de IL-7 humana sola en comparación con las condiciones de control.

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
ACADVL	0,85	0,040	1,15	0,001	0,87	0,011
AHR	0,86	0,029	1,16	0,000	1,21	0,000
AKIRIN1	0,75	0,028	0,88	0,002	0,78	0,006
ALDH16A1	1,23	0,021	1,45	0,001	1,32	0,003
ALDH5A1	0,72	0,044	0,93	0,002	1,05	0,001
APPBP2	0,81	0,001	0,90	0,000	0,81	0,000
ARHGEF1	0,85	0,001	1,05	0,000	0,88	0,000
B3GNT2	1,03	0,034	1,23	0,003	1,15	0,005
C17orf59	1,07	0,039	1,49	0,001	1,27	0,004
CCDC117	0,77	0,024	0,88	0,002	0,80	0,005
CCNI	0,73	0,004	0,98	0,000	0,78	0,001
CDK17	0,98	0,003	1,09	0,000	0,94	0,001
COTL1	1,67	0,000	1,80	0,000	1,35	0,000
CYP1B1	-0,66	0,029	-0,75	0,003	-0,69	0,006
DDI2	1,17	0,011	1,45	0,000	1,24	0,002
DEF6	1,03	0,030	1,39	0,001	1,09	0,006
DNLZ	1,17	0,029	1,19	0,008	1,22	0,006
DUSP2	1,73	0,002	2,18	0,000	2,30	0,000
ENG	-0,73	0,004	-0,61	0,005	-0,67	0,002
EXOC8	0,69	0,043	0,62	0,033	0,63	0,026
FAM160B1	0,83	0,030	1,26	0,000	0,72	0,024
FEM1B	0,99	0,005	1,09	0,000	0,87	0,005
GCFC2	1,00	0,011	0,87	0,011	0,83	0,013
GNA15	0,99	0,011	1,14	0,001	1,25	0,000
GOPC	0,83	0,015	0,64	0,029	0,69	0,015
GRSF1	0,65	0,015	0,81	0,000	0,69	0,002
HIPK3	0,67	0,025	0,79	0,002	0,69	0,006
HMHA1	0,88	0,004	1,05	0,000	0,89	0,001
HSBP1L1	1,04	0,029	0,97	0,017	0,86	0,030
JUNB	0,91	0,025	1,25	0,000	1,42	0,000
KLC2	1,08	0,036	1,18	0,007	1,34	0,002
LYSMD2	0,78	0,016	0,72	0,010	0,70	0,009
LYZ	-0,60	0,031	-0,86	0,000	-0,76	0,001
MS4A7	-0,80	0,001	-0,98	0,000	-0,59	0,006
MTA2	0,84	0,038	1,18	0,001	1,10	0,002
NCOA5	0,65	0,018	0,84	0,000	0,89	0,000
NSUN2	0,63	0,029	0,74	0,002	0,75	0,002
PITHD1	0,81	0,040	1,03	0,002	0,81	0,013
PLEKHF2	0,72	0,004	0,83	0,000	0,77	0,001

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
POLRMT	1,09	0,001	1,30	0,000	1,06	0,000
PPP2CA	0,75	0,025	0,87	0,002	0,75	0,007
PREB	0,88	0,018	0,78	0,014	0,92	0,004
PRKCH	0,70	0,011	0,88	0,000	0,78	0,001
PSMD3	1,01	0,035	1,58	0,000	1,37	0,001
PYGO2	1,08	0,003	1,07	0,001	0,74	0,016
RASSF5	0,63	0,004	0,67	0,000	0,60	0,002
RBL2	0,71	0,011	0,85	0,000	0,59	0,012
RRP1	0,69	0,019	0,62	0,013	0,80	0,002
SMCHD1	0,71	0,001	1,00	0,000	0,85	0,000
SREBF2	0,83	0,009	1,13	0,000	0,98	0,000
TAF10	1,87	0,001	1,57	0,001	1,28	0,006
TAF4B	0,75	0,030	1,12	0,000	1,29	0,000
TMX4	1,04	0,009	1,13	0,001	0,89	0,009
TPGS1	2,55	0,008	2,95	0,000	2,06	0,011
TRAM1	0,71	0,001	0,73	0,000	0,59	0,002
TRPC4AP	0,98	0,005	1,21	0,000	1,06	0,001
TTC13	0,76	0,034	0,90	0,003	0,68	0,022
UNC119	1,02	0,036	1,43	0,001	1,26	0,002
USP9X	0,90	0,000	0,92	0,000	0,85	0,000
VPS4A	0,74	0,042	0,95	0,002	0,75	0,012
ZNF800	0,74	0,013	1,01	0,000	0,84	0,001
ACTN4	0,55	0,005	0,60	0,000	0,65	0,000
C15orf48	-0,63	0,029	-0,87	0,000	-0,51	0,035
C3AR1	-0,56	0,011	-0,75	0,000	-0,64	0,001
CD247	0,80	0,004	0,87	0,000	0,50	0,038
FAM50A	0,66	0,028	0,93	0,000	0,54	0,031
HCK	-0,65	0,009	-0,83	0,000	-0,46	0,030
IL6ST	0,43	0,034	0,60	0,000	0,77	0,000
JAK1	0,71	0,001	0,80	0,000	0,58	0,002
KYNU	-0,60	0,018	-0,94	0,000	-0,56	0,007
NCF2	-0,57	0,029	-0,71	0,001	-0,70	0,001
PARP10	0,58	0,037	0,75	0,002	0,73	0,002
RAD54L2	0,61	0,037	0,66	0,008	0,53	0,033
SMG5	0,54	0,033	0,80	0,000	0,75	0,001
TOR3A	0,73	0,028	0,62	0,028	0,57	0,040
ADM	-0,88	0,005	-1,01	0,000	-0,02	0,967
CES1	-0,77	0,028	-0,78	0,008	-0,45	0,145
SLC31A2	-0,79	0,004	-0,60	0,012	-0,17	0,577

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
SMPDL3A	-1,11	0,009	-1,12	0,002	-0,56	0,149
TREM1	-0,72	0,009	-0,67	0,005	-0,28	0,287
VNN1	-0,97	0,030	-1,17	0,002	-0,35	0,423
FLT1	-1,01	0,028	-0,66	0,101	-0,80	0,039
ABCG1	0,39	0,339	0,70	0,028	0,62	0,047
ANKRD30BL	0,88	0,342	1,42	0,049	1,73	0,012
C16orf58	0,42	0,219	0,63	0,019	0,59	0,026
C6orf120	0,31	0,536	1,03	0,003	0,84	0,013
CA2	-0,33	0,450	-0,70	0,033	-0,73	0,022
CCNL2	0,51	0,178	0,75	0,012	0,59	0,049
CD14	-0,64	0,070	-0,98	0,001	-0,89	0,002
CDK16	0,64	0,118	0,96	0,004	0,80	0,014
CHTF18	0,67	0,174	0,87	0,030	1,13	0,004
CLPTM1	0,74	0,111	1,06	0,005	1,01	0,007
CREBZF	0,50	0,116	0,72	0,006	0,67	0,008
CREG1	0,70	0,095	0,86	0,013	0,99	0,004
CSF1R	-0,39	0,263	-0,71	0,010	-0,92	0,001
DAPK3	0,56	0,240	0,80	0,038	0,97	0,008
DDRKG1	0,91	0,126	1,39	0,004	1,53	0,002
DOHH	1,40	0,061	1,45	0,020	1,69	0,006
EMC8	0,61	0,229	1,15	0,004	1,04	0,008
FAM115C	0,37	0,264	0,61	0,022	0,64	0,013
FUCA1	-0,35	0,234	-0,59	0,011	-0,66	0,004
GAPT	-0,48	0,188	-0,67	0,023	-0,85	0,003
GMIP	0,55	0,076	0,78	0,002	0,70	0,005
GMPPB	0,82	0,073	0,92	0,016	0,95	0,010
HCG11	0,70	0,087	1,05	0,002	0,80	0,014
HEATR3	0,43	0,280	0,74	0,019	0,74	0,017
HEIH	0,97	0,056	1,05	0,014	0,84	0,047
HELZ2	0,42	0,287	0,77	0,013	0,77	0,010
HMG20B	0,54	0,088	0,61	0,019	0,59	0,022
HNRNPA0	0,58	0,165	0,74	0,028	0,90	0,006
HPCAL1	0,38	0,344	0,86	0,005	0,67	0,028
KIAA1919	0,63	0,116	0,81	0,013	0,66	0,042
KLHDC2	0,54	0,149	0,71	0,019	0,62	0,040
LTB	0,45	0,248	0,92	0,003	0,82	0,007
MAF1	0,86	0,161	1,54	0,002	1,38	0,005
MAFF	0,54	0,249	0,81	0,029	1,19	0,001
MAP3K11	0,49	0,263	0,77	0,030	0,70	0,044

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
MGST1	-1,05	0,089	-1,24	0,015	-1,06	0,036
MIER2	0,89	0,112	0,93	0,047	1,25	0,006
MOB2	0,69	0,150	1,05	0,007	0,90	0,017
PET100	-0,32	0,298	-0,61	0,013	-0,61	0,010
PLK3	0,20	0,700	0,79	0,021	0,83	0,012
POLG	0,52	0,086	0,97	0,000	0,79	0,002
PSMD2	0,41	0,212	0,62	0,018	0,61	0,017
RAB13	-0,50	0,089	-0,73	0,002	-0,62	0,009
RASAL3	0,74	0,067	0,92	0,006	0,72	0,028
RELB	0,22	0,633	0,63	0,046	0,69	0,022
RGMB	0,58	0,173	0,80	0,020	0,74	0,028
RNF10	0,56	0,095	0,67	0,016	0,66	0,014
RNF149	0,60	0,077	0,69	0,016	0,69	0,012
RPL39L	-1,02	0,125	-1,09	0,049	-1,41	0,008
RPUSD1	0,76	0,105	0,84	0,031	1,00	0,008
SCARF1	0,39	0,408	0,77	0,032	1,13	0,002
SENP6	0,44	0,204	0,69	0,012	0,72	0,007
SIPA1L3	-0,01	0,992	0,71	0,021	0,74	0,013
SLC25A22	0,51	0,283	0,75	0,047	0,83	0,024
SLC38A10	0,24	0,595	0,76	0,014	0,66	0,030
SLC43A2	0,66	0,068	0,63	0,040	0,99	0,001
SPATC1L	0,96	0,180	1,17	0,044	1,22	0,031
SPP1	-0,53	0,102	-0,85	0,001	-0,62	0,017
SRP68	0,68	0,096	0,77	0,024	0,98	0,003
TAZ	0,95	0,092	1,23	0,008	1,22	0,007
TCIRG1	0,79	0,069	1,15	0,001	1,15	0,002
TNFRSF1B	0,51	0,208	0,72	0,026	0,82	0,009
TNFRSF4	0,23	0,751	0,97	0,034	1,15	0,009
TNKS	0,66	0,052	0,78	0,006	0,67	0,016
TSC22D2	0,47	0,137	0,65	0,011	0,61	0,014
UBA5	0,91	0,076	1,22	0,004	1,17	0,005
USP48	0,64	0,145	0,90	0,012	0,72	0,044
VPS51	0,50	0,145	0,82	0,003	0,76	0,005
ZFAND5	0,56	0,054	0,71	0,003	0,64	0,007
ZNF259	0,47	0,242	0,85	0,007	0,65	0,038
ZNF496	0,51	0,220	0,86	0,008	0,83	0,009
ZNF696	0,80	0,061	1,09	0,002	0,75	0,033
ANXA1	-0,43	0,034	-0,49	0,005	-0,63	0,000
C12orf75	-0,45	0,041	-0,43	0,022	-0,61	0,001

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
C18orf32	-0,56	0,040	-0,61	0,008	-0,48	0,036
CHMP7	0,50	0,028	0,64	0,001	0,55	0,004
DNAJC3	-0,49	0,004	-0,62	0,000	-0,36	0,013
EVI2B	-0,36	0,046	-0,38	0,013	-0,75	0,000
HCST	-0,54	0,034	-0,45	0,042	-0,65	0,003
HSBP1	-0,44	0,009	-0,64	0,000	-0,46	0,002
PAPOLA	0,57	0,018	0,72	0,000	0,55	0,006
PPBP	-0,55	0,018	-0,65	0,001	-0,50	0,010
TIMP1	-0,52	0,019	-0,65	0,001	-0,57	0,002
TLR2	-0,42	0,044	-0,60	0,001	-0,35	0,048
UBE2D2	0,49	0,040	0,74	0,000	0,49	0,013
AGTRAP	-0,52	0,040	-0,66	0,002	-0,42	0,51
CXCL16	-0,55	0,034	-0,60	0,006	-0,38	0,091
P2RX4	-0,48	0,034	-0,60	0,002	-0,06	0,846
P2RX7	-0,72	0,018	-0,54	0,039	0,32	0,258
SLAMF7	-0,44	0,011	-0,64	0,000	-0,19	0,251
SLC2A6	-0,59	0,028	-0,56	0,013	-0,13	0,648
SUGP2	0,64	0,005	0,50	0,012	0,33	0,114
TNFAIP6	-0,55	0,029	-0,90	0,000	-0,13	0,637
TNIP3	-0,55	0,028	-0,61	0,004	-0,21	0,385
CYBA	-0,53	0,030	-0,39	0,065	-0,63	0,002
EPG5	0,59	0,034	0,39	0,112	0,57	0,013
RNF135	-0,57	0,043	-0,33	0,209	-0,64	0,006
ALDH1B1	-0,79	0,036	-0,38	0,294	-0,36	0,311
CKS2	-0,85	0,048	-0,61	0,109	-0,59	0,116
ETFDH	-0,71	0,003	-0,36	0,090	-0,40	0,054
FPR1	-0,87	0,029	-0,62	0,076	-0,29	0,467
GSTT1	-0,94	0,030	-0,52	0,195	-0,46	0,254
NFYB	-0,61	0,025	-0,42	0,075	-0,14	0,633
PREP	0,72	0,030	0,48	0,102	0,48	0,092
TGFBI	-0,99	0,007	-0,27	0,477	-0,36	0,310
TMEM160	-0,75	0,030	-0,30	0,373	-0,55	0,062
TYMP	-0,75	0,040	-0,38	0,278	-0,17	0,687
UBE3D	-0,96	0,046	-0,35	0,477	-0,33	0,497
ZNF619	0,79	0,043	0,49	0,170	0,52	0,128
ABCA1	-0,43	0,068	-0,60	0,002	-0,39	0,044
ACTR6	-0,31	0,332	-0,65	0,007	-0,56	0,020
ANXA5	-0,40	0,089	-0,66	0,001	-0,39	0,046
C16orf70	-0,21	0,548	-0,56	0,021	-0,68	0,005

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
CAND1	0,54	0,102	0,56	0,046	0,88	0,001
CAPG	-0,50	0,076	-0,74	0,001	-0,48	0,036
CCDC66	-0,41	0,204	-0,55	0,037	-0,70	0,006
COMMD8	-0,33	0,165	-0,59	0,002	-0,40	0,034
CPD	0,52	0,055	0,46	0,043	0,64	0,004
CYB5R1	-0,25	0,327	-0,51	0,011	-0,72	0,000
DUSP6	-0,45	0,129	-0,61	0,013	-0,48	0,049
ENY2	-0,45	0,067	-0,46	0,026	-0,59	0,004
FCER1G	-0,45	0,165	-0,75	0,004	-0,51	0,049
FRMD8	0,52	0,053	0,72	0,001	0,49	0,028
GSR	0,43	0,086	0,71	0,001	0,50	0,014
KIF1B	0,45	0,092	0,59	0,007	0,57	0,008
MEF2D	0,53	0,103	0,60	0,028	0,57	0,035
MPZL1	0,38	0,220	0,58	0,020	0,75	0,002
MRPS6	-0,43	0,075	-0,55	0,006	-0,88	0,000
NDUFA5	-0,25	0,247	-0,60	0,000	-0,36	0,037
NDUFB7	-0,37	0,213	-0,49	0,043	-0,62	0,007
NUP153	0,34	0,228	0,57	0,009	0,62	0,005
S100A4	-0,41	0,120	-0,54	0,014	-0,82	0,000
S100A8	-0,38	0,266	-0,56	0,043	-0,77	0,004
SERPINA1	-0,46	0,067	-0,69	0,001	-0,47	0,021
SLC17A5	-0,33	0,173	-0,51	0,010	-0,72	0,000
SLC7A7	-0,47	0,076	-0,68	0,002	-0,52	0,016
SNRK-AS1	0,59	0,079	0,57	0,042	0,59	0,031
STAT5A	0,34	0,166	0,66	0,001	0,49	0,012
TBXAS1	-0,27	0,390	-0,49	0,043	-0,64	0,007
TFPI2	-0,52	0,079	-0,65	0,008	-0,49	0,042
TMEM184B	0,22	0,545	0,63	0,013	0,55	0,027
TYROBP	-0,35	0,212	-0,56	0,012	-0,84	0,000
USMG5	-0,39	0,120	-0,49	0,018	-0,68	0,001
USP19	0,48	0,145	0,76	0,005	0,54	0,044
USP38	0,44	0,105	0,49	0,029	0,61	0,006
XYLT2	0,27	0,329	0,60	0,005	0,57	0,006
ACTR5	0,56	0,137	0,74	0,018	0,53	0,093
ADAMDEC1	-0,88	0,095	-1,24	0,004	-0,63	0,176
ARHGAP18	-0,55	0,094	-0,63	0,021	-0,51	0,060
AUH	1,01	0,101	1,14	0,026	0,67	0,223
BAG2	0,29	0,548	0,70	0,042	0,42	0,254
BAIAP2	-0,44	0,367	-0,82	0,031	-0,32	0,474

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
BLOC1S3	-0,54	0,180	-0,71	0,029	-0,37	0,290
C16orf54	0,44	0,128	0,62	0,008	0,20	0,477
C1orf216	0,25	0,669	0,82	0,042	0,55	0,193
C2orf49	-0,47	0,455	-0,97	0,040	-0,44	0,407
C3orf58	0,46	0,182	0,60	0,032	0,43	0,144
CAMK1D	0,47	0,228	0,64	0,040	0,48	0,136
CCL2	-0,33	0,522	-0,86	0,019	0,52	0,186
CCL7	-0,48	0,282	-0,90	0,010	0,36	0,355
CCRL2	-0,42	0,263	-0,76	0,011	0,09	0,848
CD33	-1,08	0,261	-1,61	0,039	-1,28	0,103
CD6	0,12	0,833	0,67	0,042	0,51	0,134
CD68	-0,35	0,184	-0,66	0,002	-0,36	0,093
CDC42EP2	-0,30	0,490	-0,66	0,037	0,08	0,864
CLEC4E	-0,61	0,086	-0,94	0,001	-0,53	0,069
CLEC7A	-0,35	0,521	-0,83	0,034	-0,51	0,223
CPNE8	-0,52	0,422	-1,02	0,036	-0,32	0,601
CSF3	0,03	0,959	-0,63	0,030	0,30	0,353
CTSF	0,32	0,628	1,25	0,006	0,88	0,051
DAB2	-0,62	0,089	-0,67	0,029	-0,49	0,119
DFNA5	-0,63	0,080	-0,89	0,002	-0,33	0,311
ECI1	0,62	0,167	0,78	0,031	0,45	0,249
ELAVL1	0,56	0,120	0,74	0,013	0,51	0,091
ERO1L	-0,52	0,086	-0,85	0,001	-0,31	0,252
EXOSC4	-0,51	0,130	-0,69	0,013	-0,23	0,491
FAM105A	0,50	0,080	0,76	0,001	0,44	0,064
FAM83G	0,39	0,431	0,82	0,029	0,71	0,055
FCAR	-0,32	0,280	-0,71	0,002	-0,31	0,211
FGR	-0,41	0,067	-0,67	0,000	-0,27	0,169
FHL3	0,57	0,180	0,72	0,035	0,24	0,572
FKBP8	0,39	0,166	0,68	0,002	0,28	0,250
FLI1	0,63	0,053	1,03	0,000	0,51	0,065
FPR2	-0,36	0,529	-0,88	0,032	0,11	0,867
G0S2	-0,40	0,231	-0,65	0,015	0,02	0,973
GEMIN2	-0,13	0,855	-0,85	0,041	-0,38	0,420
GGH	-0,45	0,302	-0,73	0,034	-0,59	0,091
GIMAP1	0,39	0,256	0,69	0,012	0,47	0,097
GIMAP1-						
GIMAP5	1,89	0,075	1,77	0,047	0,95	0,331
GNG10	-0,30	0,280	-0,61	0,005	-0,10	0,752

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
GPR137B	-0,51	0,376	-0,90	0,044	-0,31	0,566
GPR35	-0,41	0,322	-0,70	0,031	-0,12	0,791
GPR84	-0,38	0,154	-0,68	0,002	0,05	0,891
GTF2I	0,85	0,101	1,11	0,009	0,75	0,082
GZMM	0,55	0,215	0,77	0,029	0,31	0,448
HBEGF	-0,57	0,080	-0,76	0,004	0,02	0,970
HECTD3	0,61	0,107	0,66	0,038	0,38	0,267
HLCS	0,46	0,310	0,80	0,024	0,59	0,105
IFFO1	0,50	0,145	0,61	0,032	0,23	0,487
IGSF6	-0,65	0,058	-0,85	0,003	-0,23	0,502
IL19	-0,62	0,543	-1,55	0,033	-0,56	0,516
IL1R2	-0,38	0,627	-1,20	0,025	-0,63	0,285
IL24	-0,86	0,053	-0,92	0,013	-0,51	0,201
IL6	-0,43	0,196	-0,68	0,012	0,14	0,701
ILF3-AS1	-0,50	0,263	-0,76	0,035	-0,26	0,542
ISY1-RAB43	0,18	0,841	-1,07	0,033	0,24	0,717
JTB	0,24	0,621	0,73	0,030	0,33	0,372
KCNA3	0,08	0,879	0,85	0,005	0,37	0,264
KMO	-0,50	0,122	-0,72	0,006	-0,38	0,183
LACC1	-0,40	0,071	-0,65	0,000	-0,27	0,171
LILRB3	-0,31	0,410	-0,67	0,017	0,12	0,763
MET	-0,36	0,419	-0,67	0,049	-0,06	0,916
MMP1	-0,29	0,342	-0,74	0,001	-0,29	0,245
MMP19	-0,34	0,254	-0,59	0,013	-0,32	0,204
MTERFD1	-0,02	0,982	-0,61	0,048	-0,38	0,249
NCF1	-0,48	0,214	-0,85	0,006	-0,39	0,241
NCF1C	-0,56	0,254	-1,07	0,005	-0,53	0,198
NENF	0,90	0,068	0,97	0,018	0,51	0,247
OCEL1	0,70	0,198	1,04	0,018	0,57	0,232
PEX26	0,54	0,179	0,83	0,010	0,47	0,166
PGAM5	0,47	0,256	0,82	0,013	0,63	0,055
PHF1	0,08	0,883	0,65	0,043	0,38	0,270
PIGP	-0,03	0,970	-0,68	0,046	-0,24	0,557
PILRA	-0,49	0,095	-0,75	0,002	-0,45	0,063
PKIA	0,57	0,256	0,86	0,034	0,54	0,211
PLA2G7	-0,53	0,058	-0,73	0,002	-0,33	0,187
PLAUR	-0,32	0,229	-0,68	0,001	-0,21	0,363
PMP22	-0,72	0,132	-1,08	0,005	-0,45	0,290
PTAFR	-0,58	0,099	-0,73	0,012	0,08	0,867

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
QPCT	-0,57	0,108	-0,81	0,005	-0,53	0,072
RAB2A	0,45	0,198	0,60	0,033	0,53	0,059
RAC1	0,90	0,065	1,13	0,005	0,76	0,063
RALY	0,39	0,234	0,60	0,023	0,44	0,107
RANBP10	0,14	0,738	0,59	0,026	0,31	0,293
RASA3	0,38	0,120	0,66	0,001	0,34	0,102
RAVER1	0,43	0,182	0,62	0,017	0,50	0,053
RCN2	0,48	0,231	0,76	0,017	0,41	0,234
RETSAT	0,48	0,231	0,65	0,047	0,59	0,065
RSPH3	-0,13	0,841	-0,95	0,008	-0,29	0,497
SEMA4A	-0,53	0,057	-0,69	0,003	-0,04	0,911
SEPHS2	0,43	0,503	1,00	0,030	0,87	0,055
SLAMF8	-0,27	0,544	-0,64	0,040	0,53	0,087
SNAPC1	-0,34	0,325	-0,64	0,016	-0,30	0,300
SUSD3	0,53	0,101	0,59	0,027	0,41	0,136
TAF1A	-0,23	0,588	-0,60	0,043	-0,03	0,954
TBC1D17	0,37	0,330	0,65	0,029	0,38	0,227
TBC1D22A	0,38	0,254	0,62	0,020	0,23	0,469
TBC1D25	0,37	0,298	0,71	0,010	0,44	0,120
TBL2	0,31	0,450	0,68	0,026	0,23	0,542
TFE3	0,23	0,552	0,61	0,027	0,41	0,159
THBS1	-0,37	0,256	-0,64	0,012	-0,49	0,053
TLR8	-0,74	0,089	-0,88	0,015	-0,03	0,963
TMEM176B	-0,94	0,068	-1,03	0,016	-0,82	0,055
TPRKB	-0,46	0,212	-0,88	0,003	-0,48	0,120
UBE3A	0,06	0,924	0,65	0,042	0,54	0,096
USP21	0,37	0,272	0,75	0,004	0,27	0,363
VAMP4	-0,31	0,375	-0,61	0,024	-0,40	0,163
VNN2	-0,47	0,086	-0,60	0,008	-0,41	0,074
WBP5	-0,97	0,205	-1,42	0,020	-0,70	0,298
XPOT	0,78	0,061	0,78	0,026	0,57	0,108
ZDHHC3	0,56	0,095	0,73	0,008	0,30	0,328
ZER1	0,58	0,161	0,78	0,019	0,36	0,333
ZNF589	0,27	0,504	0,73	0,012	0,25	0,474
ZNF71	0,55	0,101	0,65	0,020	0,23	0,487
ZNF792	0,70	0,108	0,95	0,008	0,67	0,063
ABHD14A	-0,24	0,527	0,00	1,000	-0,62	0,018
ACSL1	0,07	0,872	-0,08	0,823	0,62	0,014
AGO2	0,21	0,547	0,31	0,259	0,71	0,003

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
APOBEC3D	0,20	0,673	0,12	0,801	0,68	0,034
ARHGAP31	0,22	0,582	0,28	0,364	0,60	0,026
ATF3	0,18	0,771	0,04	0,949	0,89	0,017
B3GNT5	0,11	0,855	-0,01	0,985	0,81	0,013
BACH2	0,26	0,352	0,25	0,296	0,71	0,001
C19orf43	-0,57	0,055	-0,30	0,285	-0,59	0,014
C9orf69	0,34	0,319	0,40	0,153	0,64	0,012
CCL4	-0,15	0,757	-0,39	0,248	0,94	0,002
CCL8	-0,28	0,813	-0,94	0,214	2,02	0,003
CCR2	-0,56	0,174	-0,32	0,412	-1,00	0,002
CD160	-0,64	0,288	-0,74	0,143	2,02	0,000
CD274	-0,28	0,494	-0,36	0,285	0,78	0,008
CD36	-0,77	0,172	-0,72	0,129	-1,26	0,005
CD52	-0,08	0,769	-0,25	0,155	-0,61	0,000
CD69	0,02	0,974	-0,08	0,770	0,82	0,000
CD72	-0,30	0,499	-0,29	0,431	0,65	0,038
CHKA	-0,41	0,410	-0,56	0,156	-0,76	0,039
CLIC3	0,05	0,939	-0,05	0,913	-0,67	0,041
COMMD3- BMI1	0,34	0,655	0,21	0,771	-1,41	0,005
COX17	-0,21	0,616	-0,45	0,133	-0,67	0,015
CRTAM	-0,39	0,388	-0,39	0,310	1,05	0,002
CSF2	0,11	0,939	0,79	0,337	1,61	0,024
CSF2RB	0,04	0,930	0,01	0,989	0,73	0,004
CX3CR1	-0,19	0,662	-0,24	0,493	-0,64	0,023
CXCL10	-0,55	0,511	-0,36	0,648	1,58	0,007
CXCL9	-0,32	0,687	-0,05	0,956	1,61	0,002
DUSP1	0,85	0,133	0,82	0,088	0,93	0,043
DVL2	0,54	0,143	0,58	0,058	0,61	0,040
EGR2	-0,67	0,094	-0,45	0,210	0,85	0,008
EIF4EBP1	-0,46	0,260	-0,15	0,737	-0,81	0,010
EPSTI1	0,09	0,874	0,16	0,728	0,75	0,021
FAM91A1	0,35	0,338	0,50	0,083	0,59	0,034
FASLG	0,05	0,933	0,06	0,881	0,76	0,007
FBXO30	0,27	0,586	0,63	0,077	0,76	0,024
FGFBP2	-0,16	0,647	-0,23	0,384	-0,77	0,001
FUS	0,30	0,429	0,37	0,238	0,61	0,029
GBP1	-0,22	0,716	-0,34	0,475	1,07	0,005
GBP1P1	-0,19	0,820	-0,02	0,979	1,11	0,019

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
GBP2	0,04	0,924	0,02	0,956	0,61	0,004
GBP4	0,00	0,997	0,08	0,823	0,74	0,002
GBP5	0,00	1,000	0,06	0,921	1,14	0,002
GCHFR	-0,03	0,952	-0,16	0,574	-0,64	0,004
GIMAP8	0,37	0,298	0,49	0,092	0,59	0,035
GZMA	-0,28	0,298	-0,29	0,194	-0,61	0,003
GZMB	0,05	0,916	-0,08	0,829	0,71	0,002
GZMH	-0,23	0,512	-0,36	0,181	-0,68	0,005
HAVCR2	0,07	0,858	-0,19	0,435	0,66	0,001
HIST1H2BK	-0,29	0,391	-0,47	0,076	-0,71	0,005
HIVEP1	0,36	0,213	0,09	0,783	0,65	0,005
HSPBP1	0,53	0,153	0,49	0,120	0,78	0,007
HSPH1	0,40	0,414	0,71	0,056	0,72	0,046
IFNG	0,32	0,706	-0,32	0,654	1,21	0,024
IGF2R	0,15	0,664	0,37	0,119	0,66	0,003
IKZF2	0,20	0,664	0,42	0,212	0,61	0,049
IL21R-AS1	0,16	0,635	0,34	0,172	0,61	0,007
INADL	0,56	0,070	0,45	0,088	0,59	0,018
INHBA	-0,08	0,885	-0,24	0,549	0,89	0,005
INIP	-0,50	0,067	-0,38	0,111	-0,59	0,008
INTS3	0,55	0,092	0,49	0,079	0,67	0,010
IRF1	0,01	0,996	0,13	0,727	0,68	0,013
IRF4	0,36	0,256	0,41	0,113	1,03	0,000
IRF8	-0,09	0,790	0,01	0,982	0,71	0,000
IRG1	-0,36	0,567	-0,45	0,380	1,41	0,002
ISOC2	0,30	0,564	0,07	0,898	0,74	0,036
JAK2	0,63	0,087	0,53	0,091	0,98	0,001
JUN	0,06	0,880	0,23	0,400	0,76	0,002
KCNK6	0,37	0,503	0,60	0,144	0,80	0,040
KDM6B	-0,05	0,911	0,19	0,527	0,66	0,006
KHK	-0,81	0,070	-0,17	0,733	-0,73	0,047
KIR2DL4	-0,26	0,656	-0,39	0,402	1,02	0,008
KLRB1	-0,13	0,622	-0,26	0,178	-0,82	0,000
LGALS1	-0,42	0,178	-0,49	0,052	-0,69	0,005
LIMK2	-0,08	0,879	-0,01	0,976	0,79	0,006
LMNB1	0,13	0,793	0,30	0,418	0,72	0,018
LOC729013	-0,42	0,503	-0,39	0,469	-0,93	0,035
LRCH4	0,72	0,170	0,74	0,087	0,89	0,033
LST1	-0,45	0,432	-0,83	0,055	-1,03	0,013

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
MAP3K13	-0,09	0,837	-0,38	0,125	-0,64	0,006
MB21D1	0,00	1,000	0,15	0,701	0,76	0,009
MFGES8	0,08	0,941	0,21	0,792	-1,17	0,034
MPPE1	-0,31	0,477	-0,43	0,220	-0,77	0,013
NAB2	0,25	0,731	0,55	0,278	1,23	0,006
NDUFAF6	-0,27	0,557	-0,54	0,115	-0,65	0,044
NFKBIB	0,08	0,881	0,21	0,576	0,60	0,043
NOP14	0,14	0,821	0,55	0,164	0,80	0,028
NR4A1	0,12	0,777	0,06	0,871	0,95	0,000
NR4A2	-0,09	0,841	-0,25	0,373	0,75	0,002
OSBPL5	-0,55	0,152	-0,21	0,581	-0,62	0,046
PAGR1	0,48	0,159	0,54	0,051	0,64	0,016
PIM3	0,05	0,930	0,42	0,181	0,59	0,040
PLEK	-0,08	0,853	-0,17	0,579	0,82	0,001
PML	0,51	0,168	0,56	0,067	0,62	0,036
PPP1R15B	0,27	0,302	0,32	0,143	0,60	0,003
PTGES2	-0,39	0,545	-0,64	0,189	-1,00	0,026
PTGS2	0,12	0,854	-0,02	0,971	0,79	0,022
PYCARD	-0,16	0,703	-0,21	0,550	-0,60	0,032
RAB20	-0,28	0,509	-0,34	0,324	0,61	0,045
RGS16	-0,16	0,809	-0,07	0,901	1,09	0,004
RNF19A	0,22	0,457	0,26	0,282	0,67	0,002
RPL21	-0,54	0,132	-0,10	0,809	-0,84	0,004
RPL34	-0,07	0,837	-0,10	0,709	-0,59	0,003
RPS29	-0,02	0,975	-0,06	0,878	-0,60	0,024
SBNO2	0,14	0,758	0,23	0,515	0,59	0,044
SERPINE2	-0,19	0,655	0,02	0,957	0,63	0,026
SH2D1B	-0,11	0,749	-0,09	0,742	0,94	0,000
SH3BGRL3	-0,28	0,207	-0,26	0,180	-0,66	0,000
SLC25A20	-0,14	0,731	-0,33	0,257	-0,59	0,024
SLC7A5	0,33	0,355	0,21	0,530	0,60	0,024
SLMO2-ATP5E	-0,30	0,893	-0,82	0,594	-2,45	0,042
SMG6	0,30	0,410	0,45	0,121	0,62	0,021
SMIM11	-0,40	0,417	-0,43	0,299	-0,74	0,045
SMIM14	-0,32	0,165	-0,36	0,057	-0,68	0,000
SNHG8	-0,25	0,666	-0,37	0,400	-0,80	0,034
SPRY2	-0,16	0,880	-0,46	0,531	1,37	0,018
SRC	0,25	0,549	0,32	0,341	0,59	0,042
SREBF1	0,41	0,509	0,58	0,233	0,93	0,034

Gen	N13B2-h3VL6		MD707-13 IgG4 # 1		1A11 IgG1 # 2	
	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p	Logaritmo FC/No estim	Aj. del valor p
STARD4	0,21	0,583	0,33	0,268	0,83	0,002
STAT1	0,20	0,582	0,23	0,428	0,64	0,008
SUMF1	-0,17	0,683	-0,37	0,222	-0,64	0,017
TAGAP	0,03	0,937	0,08	0,793	1,06	0,000
TESK1	-0,06	0,921	0,18	0,645	0,63	0,038
TMEM165	0,42	0,303	0,57	0,083	0,65	0,038
TNF	-0,33	0,261	-0,32	0,206	0,61	0,007
TNFRSF10A	0,34	0,619	0,63	0,215	0,93	0,044
TNFRSF9	0,02	0,976	-0,09	0,807	1,08	0,000
TP53I13	0,53	0,210	0,62	0,073	0,84	0,010
TYSND1	-0,24	0,590	-0,10	0,818	-0,70	0,018
UBE2D1	0,63	0,111	0,62	0,066	0,91	0,005
XCL1	-0,07	0,941	0,02	0,979	2,19	0,000
XCL2	-0,25	0,805	0,77	0,257	2,83	0,000
ZNF326	-0,37	0,344	-0,53	0,088	-0,60	0,044

Tabla 6: Lista de genes significativamente (FDR 5%) y diferencialmente (multiplicados por >1,5) expresados tras la incubación de PBMC humanas (n = 7) con mAb anti-IL7Ra en comparación con células no estimuladas.

El análisis por diagrama de Venn (Figura 11C) identificó 61 genes comunes diferencialmente expresados con los tres mAb sin ningún enriquecimiento particular de ontología génica GoMiner. A pesar de los 61 genes comunes, el anticuerpo de la invención induce sólo 31 modificaciones génicas significativas sin enriquecimiento de ontología génica. En contraste, los dos anticuerpos de la técnica previa inducen una importante modificación transcripcional del transcriptoma de PBMC humanas, con 245 genes diferencialmente expresados inducidos por mAb de la IgG4 #1 sitio 1 y 237 genes diferencialmente expresados inducidos por el mAb de la IgG1 #2 sitio 1. Setenta y ocho genes diferencialmente expresados eran comunes entre estos dos mAb sitio 1, pero estos genes no son expresados diferencialmente cuando las PBMC son estimuladas con N13B2-hVL6.

El análisis de componentes principales (PCA, *por sus siglas en inglés*) de la IL-7 muestra que los genes diferencialmente expresados inducidos por los anticuerpos de la técnica previa son muy diferentes de los genes diferencialmente expresados inducidos por la IL-7. El enriquecimiento de ontología génica de GoMiner sugiere que ambos anticuerpos de la técnica

previa modifican las funciones biológicas de las PBMC, tales como la activación leucocitaria, la proliferación, la migración, la quimiotaxis, la secreción de citoquinas y las respuestas inflamatorias asociadas con la vía MAPK/ERK.

Entre los 334 genes expresados diferencialmente con IL7 en comparación con la condición de control, 93 genes fueron expresados diferencialmente con un alto número de veces (>2) y fueron separados en 3 clústeres distintos mediante análisis de mapas de calor (Figura 11A). El primer clúster de genes regulados negativamente evaluados por enriquecimiento de ontología génica fue principalmente implicado en la diferenciación y apoptosis de los leucocitos, un segundo clúster de genes altamente regulados positivamente estaba asociados con la adherencia, diferenciación y activación leucocitaria, y un tercer clúster de genes regulados positivamente tenían ontología génica mixta. Curiosamente, todos los mAb ensayados (tanto sitio 1 como sitio 1/2b) mostraron efectos similares, evitando la modificación del clúster 1 y del clúster 2, pero sin impacto sobre el clúster 3 (Figura 11B).

En total, el análisis transcripcional confirmó que, a pesar de que los mAb anti IL-7R α humano sitio 1 y sitio 1/2b compartían similares propiedades antagonistas, los dos mAb sitio 1 que se describieron en el estado de la técnica indujeron significativas modificaciones transcripcionales de las PBMC humanas compatibles con las respuestas de activación e inflamatorias de células T inducidas por la vía MAPK/ERK.

El mAb anti-IL-7R α humano sitio 1/2b de la invención, es decir, N13B2-hVL6, indujo menos modificación transcripcional de PBMC humanas en comparación con los dos mAb sitio 1 descritos en el estado de la técnica.

La falta de mAb anti-IL-7R α específicos y “solo antagonistas” para especies mayores ha impedido la verificación de este efecto en los primates o seres humanos. Los inventores hallaron que las propiedades agonistas/antagonistas de los mAb anti-IL-7R α dependen del epítipo específico diana, dado que los anticuerpos del estado de la técnica que se unen al dominio de interacción de la IL-7 sitio 1 parecen tener propiedades agonistas y antagonistas, mientras que el anticuerpo de la invención que une el dominio de dimerización de IL-7R α / γ c (sitio 2b) exhibe estricta actividad antagonista. Los inventores sugieren que el anticuerpo de la invención podría perturbar la dimerización de IL-7R α / γ c requerida para la internalización y señalización del receptor. Los anticuerpos “solamente antagonistas” contra el IL-7R impidieron la inflamación de la piel mediada por células T de memoria a largo plazo en los primates, incluso después de la estimulación antigénica crónica, sin inducir linfopenia ni deficiencias funcionales o metabólicas de las células T policlonales.

Se ha demostrado que la IL-7 tiene la capacidad de inducir señales antiapoptóticas y proliferativas a través de la señalización de IL-7R, principalmente por la activación de la vía JAK/STAT. También se cree que la señalización de IL-7R involucra la vía PI3K/AKT, pero esto se ha observado en líneas celulares inmortalizadas transformadas o timocitos primarios, y estas señales no eran detectables en linfocitos T humanos periféricos vírgenes o de memoria. (Watanabe, J. Exp. Med, 1998). Varios informes han sugerido que la señalización de IL-7R podría amplificar la fosforilación de ERK en subconjuntos de linfocitos T o de células pro-B (Deshpande P. I. Immunol, 2013; Fleming HE y Paige CJ, Immunity, 2001). El papel de estas vías en la señalización de IL-7R en células T maduras y humanas es menos clara. Mediante el uso de PBMC humanas primarias recientemente aisladas (compuestas mayormente de linfocitos T y B, monocitos y células NK) de voluntarios sanos, estimuladas con una alta concentración de IL-7 recombinante humana (5000 pg/ml, mientras que la concentración en el suero es de ~ 5 pg/ml en condiciones no linfopénicas (Wong H-L, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008)), los inventores confirmaron que la IL-7 induce la fosforilación reproducible de STAT5. La activación de la señal PI3K fue más variable y no observaron ninguna fosforilación de ERK. Mientras que todos los mAb anti-IL7R α usados en este estudio fueron potentes inhibidores de pSTAT5 inducida por IL-7 y exhibieron propiedades antagonistas transcripcionales similares, se encontró que dos mAb sitio 1 del estado de la técnica indujeron señales agonistas de PI3K/ERK e importantes modificaciones transcripcionales asociadas con la activación de las células T y las respuestas inflamatorias inducidas por la vía ERK/MAPK. Estas propiedades duales opuestas, agonista/antagonista, de algunos mAb no son exclusivas, dado que otras dianas, tales como IL-4, IL-6R, IL-15, CD28, CD38, CD40, o HER2 demostraron actividades similares después de endocitosis/internalización del receptor.

La heterodimerización de este sitio 2b con TSLPR también ha sido confirmada recientemente y ha demostrado estar en condiciones para la señalización del receptor como ya se predijo para IL-7R α y la cadena γ (Verstraete K., Nature Communications, 2017). Curiosamente, el sitio de heterodimerización predicho entre IL-7R α /cadena γ e IL-7R α /TSLPR presenta un solapamiento, lo cual sugiere un mecanismo de señalización mediado por heterodimerización compartido entre ambos receptores.

Se ha encontrado que el ensayo de inhibición *in vitro* de pSTAT5 no fue predictivo de la eficacia del anticuerpo anti-IL-7R *in vivo*. En un informe anterior, otro mAb anti-IL7R α impidió la pSTAT5 inducida por IL-7 *in vitro* y *ex vivo* en primates, pero no protegió contra la inflamación cerebral en una encefalitis autoinmune experimental (EAE) en un modelo de titíes (Dunham J., J. Neuroimmune. Pharmacol, 2016).

La IL-7 ha sido bien descrita en cuanto al mantenimiento del conjunto de linfocitos T periféricos vírgenes y de memoria en ratones. Sin embargo, en primates, la importancia de la IL-7 en el mantenimiento de la homeostasis de células T periféricas podría ser menos evidente y/o mecanismos redundantes podrían explicar la diferencia entre las especies.

Estos datos mostraron que las propiedades antagonistas de los mAb anti-IL-7R α y la eficacia *in vivo* no sólo están relacionadas con la prevención de la unión de IL-7 y la inhibición de pSTAT5. Estos datos mostraron que el anticuerpo de la invención que también tiene diana en el sitio de heterodimerización del receptor (sitio 2b) es “solamente antagonista” y redundante en una mayor eficacia de las respuestas inhibitorias de células T *in vivo*.

El direccionamiento a IL7R con anticuerpos “solamente antagonista” tiene el potencial de regular la supervivencia y acumulación de las células T de memoria específicas de antígeno y, por lo tanto, podría promover la prevención de la recidiva a largo plazo en enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Referencias

- Abraham, C. & Cho, J. H. Inflammatory Bowel Disease. *New England Journal of Medicine* 361, 2066–2078 (2009).
- Adams, D. H. & Eksteen, B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 244–251 (2006).
- Agace, W. W. Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 682–692 (2006).
- Albuquerque AS, Cortesão CS, Foxall RB, Soares RS, Victorino RM, Sousa AE. Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J Immunol.* 2007 Mar 1;178(5):3252-9. PubMed PMID: 17312174.
- Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Crohn's disease. *Lancet* 380, 1590–1605 (2012).
- Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.-L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., y Stinissen, P. (2010). Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun.* 11, 326–333.
- Chothia, C., y Lesk, A.M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901–917.
- Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G. Structural repertoire of the human VH segments. *J Mol Biol.* 1992 Oct 5;227(3):799-817.
- Clark LA, Demarest SJ, Eldredge J, Jarpe MB, Li Y, Simon K, van Vlijmen HW. Influence of canonical structure determining residues on antibody affinity and stability. *J Struct Biol.* 2014 Feb;185(2):223-7. doi: 10.1016/j.jsb.2013.08.009. PubMed PMID: 23994046
- Danese, S. & Fiocchi, C. Ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 365, 1713–1725 (2011).
- Denucci, C.C., Mitchell, J.S., y Shimizu, Y. (2009). Integrin function in T-cell homing to lymphoid and nonlymphoid sites: getting there and staying there. *Crit. Rev. Immunol.* 29, 87–109.
- Feagan, B. G. et al. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *New England Journal of Medicine* 369, 699–710 (2013).
- Deshpande, P., Cavanagh, M.M., Le Saux, S., Singh, K., Weyand, C.M., y Goronzy, J.J. (2013). IL-7– and IL-15–mediated TCR sensitization enables T cell responses to self-antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 1416–1423.
- Dunham, J., Lee, L.-F., Driel, N. van, Laman, J.D., Ni, I., Zhai, W., Tu, G.-H., Lin, J.C., Bauer, J., Hart, B.A. 't, et al. (2016). Blockade of CD127 Exerts a Dichotomous Clinical Effect in Marmoset Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 11, 73–83.
- Fleming, H.E., y Paige, C.J. (2001). Pre-B Cell Receptor Signaling Mediates Selective Response to IL-7 at the Pro-B to Pre-B Cell Transition via an ERK/MAP Kinase-Dependent Pathway. *Immunity* 15, 521–531.
- Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., y Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr. Mol. Med.* 9, 836–850.

- Haas, J., Korporal, M., Schwarz, A., Balint, B., y Wildemann, B. (2011). The interleukin-7 receptor α chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* 41, 845–853.
- Haudebourg, T., Poirier, N., y Vanhove, B. (2009). Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 22, 509–518.
- He, R., y Geha, R.S. (2010). Thymic stromal lymphopoietin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183, 13–24.
- Henriques, C.M., Rino, J., Nibbs, R.J., Graham, G.J., y Barata, J.T. (2010). IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells. *Blood* 115, 3269–3277.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Reid-Miller, M., Perry, H.M. y Gottesman, K.S. (1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest (DIANE publishing, 1992).
- Kern, B., Kraynov, E., Lee, L.-F., Ray, R. (2013). Receptor occupancy and internalization of an anti-IL-7 receptor antibody. *Cytokine* 63, 276–277.
- Kern B, Li W, Bono C, Lee LF, Kraynov E. Receptor occupancy and blocking of STAT5 signaling by an anti-IL-7 receptor α antibody in cynomolgus monkeys. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016 Mar;90(2):191-8.
- Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317 (2011).
- Lei, L., Zhang, Y., Yao, W., Kaplan, M.H., y Zhou, B. (2011). Thymic Stromal Lymphopoietin Interferes with Airway Tolerance by Suppressing the Generation of Antigen-Specific Regulatory T Cells. *J. Immunol.* 186, 2254–2261.
- Mazzucchelli, R., Hixon, J.A., Spolski, R., Chen, X., Li, W.Q., Hall, V.L., Willette-Brown, J., Hurwitz, A.A., Leonard, W.J., y Durum, S.K. (2008). Development of regulatory T cells requires IL-7R α stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112, 3283–3292.
- McElroy CA, Dohm JA, Walsh ST. Structural and biophysical studies of the human IL-7/IL-7R α complex. *Structure.* 2009 Jan 14;17(1):54-65. doi: 10.1016/j.str.2008.10.019.
- McElroy CA, Holland PJ, Zhao P, Lim JM, Wells L, Eisenstein E, Walsh ST. Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Feb 14;109(7):2503-8. doi: 10.1073/pnas.1116582109
- Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullillou, J.-P., y Laplaud, D.-A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* 118, 3411–3419.
- Planell N, Lozano JJ, Mora-Buch R, Masamunt MC, Jimeno M, Ordás I, Esteller M, Ricart E, Piqué JM, Panés J, Salas A. Transcriptional analysis of the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis in remission reveals lasting epithelial cell alterations. *Gut.* 2013 Jul;62(7):967-76. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303333
- Racapé, M., Vanhove, B., Soullillou, J.-P., y Brouard, S. (2009). Interleukin 7 receptor alpha as a potential therapeutic target in transplantation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 57, 253–261.

- Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu Mr, Travis M, Zurawski SM, Johnston J, Liu YJ, Spits H, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Bazan JF. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J Immunol.* 2001 Jul 1;167(1):336-43
- Roan, F., Bell, B.D., Stoklasek, T.A., Kitajima, M., Han, H., y Ziegler, S.F. (2012). The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond. *J. Leukoc. Biol.* 91, 877–886.
- Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., y Leonard, W.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19455–19460.
- Sandborn, W. J. et al. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. *New England Journal of Medicine* 369, 711–721 (2013).
- Shochat C, Tal N, Bandapalli OR, Palmi C, Ganmore I, te Kronnie G, Cario G, Cazzaniga G, Kulozik AE, Stanulla M, Schrappe M, Biondi A, Basso G, Bercovich D, Muckenthaler MU, Izraeli S. Gain-of-function mutations in interleukin-7 receptor- α (IL7R) in childhood acute lymphoblastic leukemias. *J Exp Med.* 2011 May 9;208(5):901-8. doi: 10.1084/jem.20110580. Erratum in: *J Exp Med.* 2011 May 9;208(5):preceding 901. *J Exp Med.* 2011 Jun 6;208(6):1333
- Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., y Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* 206, 655–667.
- Van Bodegom, D., Zhong, J., Kopp, N., Dutta, C., Kim, M.-S., Bird, L., Weigert, O., Tyner, J., Pandey, A., Yoda, A., et al. (2012). Differences in signaling through the B-cell leukemia oncoprotein CRLF2 in response to TSLP and through mutant JAK2. *Blood* 120, 2853–2863.
- Verstraete, K., Peelman, F., Braun, H., Lopez, J., Van Rompaey, D., Dansercoer, A., Vandenberghe, I., Pauwels, K., Tavernier, J., Lambrecht, B.N., et al. (2017). Structure and antagonism of the receptor complex mediated by human TSLP in allergy and asthma. *Nat. Commun.* 8.
- Walsh ST. Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway. *Immunol Rev.* 2012 Nov;250(1):303-16
- Watanabe, M., Ueno, Y., Yajima, T., Okamoto, S., Hayashi, T., Yamazaki, M., Iwao, Y., Ishii, H., Habu, S., Uehira, M., et al. (1998). Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J. Exp. Med.* 187, 389–402.
- Watanabe, N., Wang, Y.-H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.-H., Cao, W., y Liu, Y.-J. (2005a). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181–1185.
- Wong, H.-L., Pfeiffer, R.M., Fears, T.R., Vermeulen, R., Ji, S., y Rabkin, C.S. (2008). Reproducibility
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Fang, C., Cousins, D., Zhang, G., Gu, S., Gao, Z., Shamji, B., et al. (2008). Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 2790–2798.
- Zhi, K., Li, M., Zhang, X., Gao, Z., Bai, J., Wu, Y., Zhou, S., Li, M., y Qu, L. (2014). $\alpha 4\beta 7$ Integrin (LPAM-1) is upregulated at atherosclerotic lesions and is involved in atherosclerosis progression. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 33, 1876–1887

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que se une específicamente a CD127, en particular a CD127 humano, que comprende:
 - una cadena liviana del anticuerpo que comprende, o un dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo que consiste en, una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 12; en particular la SEQ ID NO: 12; y
 - un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo que comprende las tres CDR que consisten en las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; en particular un dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo que consiste en la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 7.
2. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado, en particular donde el dominio constante de la cadena liviana del anticuerpo está derivado de un dominio constante de la cadena liviana kappa humana, en particular en donde el dominio constante de la cadena liviana consiste en la SEQ ID NO: 27 o 28, y en donde el dominio constante de la cadena pesada de anticuerpo está derivado de un dominio constante de la cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas, en particular de un dominio constante de la cadena pesada de IgG4 humana, en particular, en donde el dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo consiste en la SEQ ID NO: 26.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la cadena liviana del anticuerpo comprende, o el dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo consiste en, la SEQ ID NO: 12, y donde el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo consiste en la SEQ ID NO: 7.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el cual es un antagonista de la señalización de IL7-R inducida por IL-7 y que no induce la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa y/o de la vía de señalización de ERK.
5. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el cual reconoce un epítipo que comprende una secuencia tomada desde el sitio 2b del CD127 y/o interrumpe la unión del CD127 a la cadena γ c común de

receptores de citoquinas, en particular, que reconoce al menos la tercera lámina beta del sitio 2b del CD127.

6. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el cual no induce la internalización de CD127 y/o inhibe la internalización de CD127 inducida por IL7.
7. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el cual no aumenta la maduración de las células dendríticas inducida por TSLP.
8. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, el cual tiene un efecto de larga duración y/o un efecto rápido, en particular, que tiene un efecto rápido local.
9. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, el cual específicamente se une a CD127 humano con una afinidad constante KD inferior a $5E-9$ M, como puede determinarse mediante análisis mediante biosensor.
10. Una combinación de moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y, en particular, una primera molécula de ácido nucleico aislada que comprende o que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18; y una segunda molécula de ácido nucleico aislada que comprende o que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 13.
11. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y/o la combinación de moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la reivindicación 10 y un vehículo farmacéutico.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, la cual es adecuada para la administración local, en particular para la administración local subcutánea, entérica u oral y, más particularmente, para el suministro en el colon.
13. Un kit compuesto por una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12 y un dispositivo de suministro adecuado para la administración local, en particular un dispositivo de suministro por vía subcutánea, entérica u oral; más

particularmente, comprendiendo dicho dispositivo una jeringa precargada o un dispositivo sin aguja.

14. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o la combinación de moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la reivindicación 10, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 o el kit de la reivindicación 13 para su uso como medicamento.
15. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o la combinación de moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la reivindicación 10, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 o el kit de la reivindicación 13 para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 en la prevención o el tratamiento del rechazo de trasplantes de órganos o tejidos o de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedades autoinmunes, particularmente artritis reumatoide, esclerosis sistémica, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, tiroiditis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren primario y enfermedades inflamatorias, especialmente enfermedad inflamatoria intestinal (EII), más particularmente enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y encefalomiелitis, enfermedades alérgicas y cáncer, enfermedades relacionados con trasplantes y enfermedades respiratorias
16. Un método para seleccionar un compuesto del grupo que consiste en un anticuerpo, un fragmento del mismo de unión a antígeno o una molécula mimética de anticuerpo que comprende, o consiste en, al menos una de las siguientes etapas:
 - i. ensayar la capacidad de unión del compuesto a CD127, en particular a CD127 humano, en particular a una secuencia de epítopes desde el dominio D1 y/o desde el sitio 2b del dominio D2 de CD127 humano;
 - ii. ensayar la inhibición de la señalización de IL7-R inducida por la IL-7, en particular, la fosforilación de STAT5, en presencia del compuesto;
 - iii. ensayar la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa en presencia del compuesto;
 - iv. ensayar la activación de la vía de señalización de ERK en presencia del compuesto;
 - v. ensayar la capacidad de unión del compuesto a al menos la tercera lámina beta del sitio 2b de CD127, en particular a CD127 humano;y, opcionalmente, también comprende al menos una de las siguientes etapas:

vi. ensayar la unión de CD127 a la cadena común γc de receptores de citoquinas en presencia del compuesto;

vii. ensayar la internalización de CD127 y/o internalización inducida por IL7 de CD127 en presencia del compuesto;

viii. ensayar la maduración de las células dendríticas inducida por TSLP en presencia del compuesto;

particularmente donde el compuesto que se une específicamente a CD127 es un antagonista de la señalización de IL7-R inducida por IL7 y que no induce la activación de la fosfatidilinositol 3-quinasa o la vía de señalización de ERK.