

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 307**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2017** **PCT/IB2017/000293**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017** **WO17149394**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2017** **E 17716593 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 3423496**

54 Título: **Anticuerpos no antagonistas dirigidos contra la cadena alfa del dominio extracelular del receptor de IL7 y uso del mismo en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

29.02.2016 US 201662301271 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.01.2020

73 Titular/es:

**OSE IMMUNOTHERAPEUTICS (100.0%)
22 Boulevard Benoni Goullin
44200 Nantes, FR**

72 Inventor/es:

**POIRIER, NICOLAS y
MARY, CAROLINE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 737 307 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos no antagonistas dirigidos contra la cadena alfa del dominio extracelular del receptor de IL7 y uso del mismo en el tratamiento del cáncer

La invención se refiere a anticuerpos humanizados dirigidos contra el dominio extracelular de la cadena alfa del receptor para la interleucina 7 (IL-7), especialmente el receptor para la IL-7 humana expresada en células humanas (también denominada IL-7R α humana o IL-7R α o CD127) y que no interfiere con las vías de señalización de IL-7 o TSLP.

El anticuerpo de la invención no tiene efecto antagónico sobre el receptor de IL-7, pero aún puede presentar actividad citotóxica contra células CD127 positivas. En una realización particular, el anticuerpo no tiene un efecto agonista sobre el receptor de IL-7.

La invención proporciona como ejemplo, un anticuerpo que reconoce un epítipo CD127 humano que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 55 de la tabla 6.

Por consiguiente, los anticuerpos de la invención son adecuados para su uso para tratar el cáncer relacionado con la proliferación de células CD127 positivas o con una infiltración de células CD127 positivas que bloquean el sistema inmunitario en una condición tolerante.

La invención también se refiere a fragmentos de los anticuerpos, en particular, a fragmentos de unión a antígeno de estos anticuerpos, o moléculas que comprenden dichos anticuerpos o fragmentos como componentes para la preparación de agentes terapéuticos, en particular, agentes inmunoterapéuticos.

El anticuerpo de la invención se define como:

un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende las siguientes CDR:

- VH-CDR1 cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VH3-CDR1 de la SEQ ID NO: 14;
- VH-CDR2 cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VH3-CDR2 de la SEQ ID NO: 16;
- VH-CDR3, cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VH3-CDR3 de la SEQ ID NO: 18;
- VL-CDR2, cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VL3-CDR2 de la SEQ ID NO: 22;
- VL-CDR3, cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VL3-CDR3 de la SEQ ID NO: 24; y
- VL-CDR1, cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VL3-CDR1 de la SEQ ID NO: 20 o la secuencia de aminoácidos que es Effi3-VL4-CDR1 de la SEQ ID NO: 26,

en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente al dominio extracelular de CD127 humano y no es un antagonista de CD127.

Las realizaciones adicionales de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Señalización de IL-7R. La unión de IL-7 a IL-7R desencadena la activación de varias vías de señalización, incluyendo las Janus cinasas (JAK) -1 y -3, transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5) y fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3-k). Se ha documentado que las vías de STAT1 y STAT3 están activadas, aunque no parecen ser las vías principales. La activación de la vía de STAT5 es necesaria para la inducción de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la prevención de la entrada de la proteína proapoptótica Bax en la mitocondria y, por lo tanto, para la supervivencia de los precursores tímicos de linfocitos T en desarrollo. La activación de la vía de PI3-k da como resultado la fosforilación y la retención citoplásmica de la proteína proapoptótica Bad.

"Células CD127 positivas" tal como se usa en la presente invención designa células que expresan CD127 en su superficie celular, en particular células humanas que expresan CD127 humano. En la mayoría de los casos, las células CD127 positivas expresan CD127 en un complejo que forma el IL-7R (células IL-7R positivas) y/o en un complejo que forma el TSLPR (células TSLPR positivas). CD127 es expresado por varias células, incluidas tanto los linfocitos T de memoria como los no expuestos previamente. CD127 se expresa en particular por los linfocitos T efectoros (Tef), incluidos los linfocitos T restantes y de memoria, y por los linfocitos B inmaduros, y también se expresa por los linfocitos T reguladores naturales restantes (Treg naturales), aunque a niveles considerablemente más bajos. IL-7R α es esencial para promover la diferenciación de timocitos y la expansión clonal de los linfocitos.

La importancia de la vía IL7-CD127 para la homeostasis de linfocitos T sin exposición previa se destaca en varios estudios recientes que demuestran que los niveles de expresión de IL-7R α unido a membrana en linfocitos T CD4⁺ convencionales se correlacionan con las frecuencias de linfocitos T CD4⁺ emigrantes tímicos en individuos sanos y en pacientes infectados por VIH, así como en pacientes con esclerosis múltiple (EM) (Albuquerque et al., 2007) (Broux et al., 2010).

Las propiedades antagonistas tal como se describen en la presente invención pueden ser en particular antagonismo

hacia la señalización de IL-7R inducida por IL-7, especialmente la IL-7 humana. Un antagonista de la señalización de IL-7R inducida por IL-7 puede identificarse midiendo la inhibición de la fosforilación de STAT5 como se describe en los Ejemplos. La fosforilación de STAT5 inducida por IL7 es un marcador de la activación de IL7R y se espera que una interacción antagonista de IL7-IL7R disminuya la fosforilación de STAT5 inducida por IL7.

La linfopoyetina del estroma tímico, (TSLP) es una citocina de células epiteliales que es activa en la linfopoyesis y, en particular, participa en la regulación del desarrollo de las células del sistema inmunitario, dicha regulación repercute en particular en la maduración de dichas células. La TSLP humana (número de registro AF338732) es un factor que ejerce la polarización de las células dendríticas, promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B y se ha demostrado que desempeña un papel en las enfermedades de la piel y los pulmones (He y Geha, 2010).

En consecuencia, se ha demostrado que la TSLP se asocia a diversas patologías que incluyen la enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias y la dermatitis atópica en humanos y ratones (Ying et al., 2008) (Jariwala et al., 2011). Además, se ha demostrado que la TSLP se asocia a la regulación de la inmunidad intestinal y a la inflamación (Taylor et al., 2009). Las vías de señalización de TSLP se han mostrado diferentes, a nivel molecular, de la señalización inducida por IL-7 (Rochman et al., 2010).

En una realización particular, la invención se refiere al uso de anticuerpos definidos en el presente documento para agotar las subpoblaciones de linfocitos u otras poblaciones celulares que expresan CD127, especialmente CD127 humano (incluidos los linfocitos T y B normales o patológicos, las células NK, las células dendríticas y otros tipos de células, incluidas las células epiteliales) como resultado de la acción citotóxica de los anticuerpos, posiblemente pero no exclusivamente a través de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y opcionalmente a través de CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Por consiguiente, la invención se refiere al uso de los anticuerpos en el tratamiento de afecciones patológicas que implican la alteración de la respuesta inmune en un paciente humano que conduce a un estado tolerogénico dominante que implica células CD127 positivas, así como a la destrucción de células CD127 positivas malignas, como en los cánceres hematológicos.

La invención proporciona así medios adecuados para su uso en patologías tales como las inducidas por enfermedades autoinmunes, el rechazo de injertos, enfermedades alérgicas, enfermedades respiratorias, infecciones víricas crónicas, linfoma, leucemia u otras enfermedades de cáncer, incluidas las que resultan de tumores sólidos (por ejemplo, cáncer de mama) cuando estas patologías se asocian con células CD127 positivas (como las descritas en Ujije et al, *Oncolmmunology* 4:6, e1009285; Junio de 2015). Los linfocitos T sin exposición previa son en parte responsables del rechazo agudo de los órganos y tejidos trasplantados. Estas células se pueden controlar con los fármacos inmunosupresores actuales (inhibidores de la calcineurina) y con anticuerpos monoclonales que bloquean la coestimulación (inhibidores de CD80/86 antiadhesión). Los linfocitos T de memoria también son responsables del rechazo del trasplante. Los linfocitos T de memoria se acumulan en el hombre debido a los antecedentes de inmunidad adquirida, principalmente reacciones anteriores contra virus. Se ha demostrado que los linfocitos T de memoria se pueden reactivar por aloantígenos como resultado de la "inmunidad heteróloga", que es la reacción cruzada de nuestras defensas antivíricas con aloantígenos (Adams et al., 2003). La inmunidad heteróloga representa una barrera potente para la inducción de tolerancia, ya que los linfocitos T de memoria, al contrario de los linfocitos T sin exposición previa, están programados para activarse rápidamente, con un requerimiento reducido de señales coestimuladoras. Los linfocitos T de memoria también pueden estar implicados en el rechazo crónico. Además de su papel en el trasplante de órganos y tejidos, los linfocitos T sin exposición previa y de memoria también son corresponsables de muchas enfermedades autoinmunes. Este es el caso de la colitis ulcerosa (Shinohara et al., 2011), la artritis reumatoide, la psoriasis o la enfermedad de injerto contra huésped.

Asimismo, se ha demostrado que varias células malignas presentan IL-7R. Este es el caso del linfoma cutáneo de Sezary (el 60 % de ellos) o la leucemia linfoblástica aguda infantil en la que aproximadamente el 15 % de los casos desarrollan mutación de ganancia de función en CD127, haciendo que estos tumores sean parcialmente dependientes de IL-7 (Shochat et al., 2011).

El agotamiento de los linfocitos T ha sido un obvio enfoque inmunosupresor para contrarrestar el rechazo de aloinjertos o combatir la autoinmunidad. Sin embargo, el agotamiento total de linfocitos T podría no ser favorable para la inducción de tolerancia inmunológica.

El direccionamiento de subpoblaciones de linfocitos T o de linfocitos T activados selectivamente (efectores), sin modificar los linfocitos Treg, podría constituir una estrategia protolerogénica (Haudebourg et al., 2009). Por lo tanto, se puede considerar CD127 como una posible diana terapéutica atractiva para los anticuerpos monoclonales (Mab) destinados a modular las respuestas inmunitarias, ya que dichos anticuerpos monoclonales podrían tener el potencial de agotar los linfocitos efectores pero no los linfocitos reguladores. Por consiguiente, se ha asumido que podrían presentar eficacia en el trasplante, la autoinmunidad (Michel et al., 2008) y tumores malignos al antagonizar el acceso de IL-7 a IL7-R y, por lo tanto, limitar la función y el crecimiento de los linfocitos T y B.

Una terapia con un anticuerpo monoclonal contra las células CD127+ sin interferir con las vías de IL-7 y TSLP podría cumplir ese objetivo mediante la eliminación/neutralización de los linfocitos T sin exposición previa y de memoria, al tiempo que conserva los linfocitos Treg o la eliminación de células CD127 positivas malignas.

En este contexto, los anticuerpos monoclonales contra IL-7R α que tienen propiedades antagonistas frente a IL-7R α se han desvelado en el documento WO2010/017468 y sus versiones humanizadas en el documento WO2011/094259 con el fin de tratar enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple. Se dice que los anticuerpos descritos son antagonistas de la unión de IL-7 a su receptor, y activos contra la expansión y la supervivencia de células Th17 y Th1 que se dice que requieren la interacción de IL-7 con su receptor de CD127. De forma similar, los anticuerpos anti-CD127 documentados en los documentos WO2011/104687 o WO2013/056984, que se contemplan para su uso en el tratamiento de la diabetes, lupus, artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes, no se han tratado con respecto a su posible efecto sobre su interacción con la señalización inducida por TSLP no se ha documentado.

En una publicación (Racapé et al., 2009), los autores analizaron el interés del receptor alfa de IL-7 como una posible diana terapéutica en el trasplante. Habiendo revisado la expresión de IL-7R α en varios linfocitos T y linfocitos sensibles a IL-7, los autores determinaron si el direccionamiento de los linfocitos T de memoria que expresan IL-7R α podría prolongar la supervivencia del aloinjerto en ratones y concluyeron que el direccionamiento de IL-7 o IL-7R α ventajosamente ahorraría linfocitos Treg. Entre las perspectivas, los autores señalaron que el direccionamiento de IL-7 o IL-7R α en el tratamiento terapéutico podría tener diferentes consecuencias en la supervivencia de las células que expresan CD127 y podría provocar diferentes tipos de linfopenia. La cuestión de los efectos de los anticuerpos que se dirigirían contra IL-7R α dependiendo de si serían anticuerpos de bloqueo o neutralización o citotóxicos también se planteó desde un punto de vista conceptual. Sin embargo, los autores no demostraron haber obtenido y analizado dichos anticuerpos y expresaron la necesidad de un estudio adicional para evaluar la relevancia de la hipótesis. En vista de los inconvenientes de los enfoques terapéuticos disponibles en enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y otras enfermedades que implican el IL-7/IL-7R α , como los diferentes tipos de cáncer, incluyendo algunos cánceres de mama, todavía hay una necesidad de más candidatos de fármacos, especialmente para candidatos activos con respecto a dianas más selectivas con el fin de controlar, por ejemplo, modular la activación inmunitaria en pacientes humanos.

Un anticuerpo de este tipo sería eficaz en una estrategia de combinación para la terapia del cáncer con radioterapia de primera línea de tratamiento, quimioterapia, inmunoterapia, en particular con inhibidores del punto de control, como los anticuerpos anti-CTLA4 o anti-PDL1 o anti-Sirpalfa.

Los inventores satisfacen esta necesidad al proporcionar anticuerpos que tienen la capacidad de reconocer y eliminar los linfocitos T efectores, al tiempo que conservan los linfocitos T reguladores capaces de inducir tolerancia en el trasplante y que han demostrado la capacidad de eliminar las células CD127+ malignas de leucemia.

La solicitud de patente internacional WO2013056984 desvela anticuerpos dirigidos contra el dominio extracelular de la cadena alfa del IL7-R humano con una actividad antagonista y una actividad citotóxica para agotar las subpoblaciones de linfocitos u otras poblaciones de células que expresan CD127. El anticuerpo MD707-3 desvelado comprende las cadenas VH y VL (secuencias 56 y 57 en la Tabla 6) que sirvieron para derivar el presente anticuerpo. Los anticuerpos MD707-3 son antagonistas del IL7-R y en particular inhiben la fosforilación de Stat5 inducida por la IL7. Por el contrario, el anticuerpo humanizado de la presente invención, derivado de MD707-3, sorprendentemente, no es un antagonista de IL7-R al tiempo que conserva una buena unión al dominio extracelular de CD127 y la posibilidad de mediar el efecto citotóxico en células que expresan CD127. Asimismo, el anticuerpo MD707-3 es un antagonista de TSLPR, como se muestra en la figura 3.b del presente documento, mientras que el anticuerpo humanizado derivado del mismo, llamado Effi3 en el presente documento, no lo es.

Los inventores proporcionan medios adecuados en este contexto, ya que obtuvieron anticuerpos monoclonales contra IL-7R α y eso no interfiere con la vía de TSLP al contrario de lo que observaron los inventores con el anticuerpo MD707-3, parental del anticuerpo de la presente invención. MD707-3 mostró propiedades antagonistas de TSLP y potenció la maduración de las células dendríticas caracterizada por la expresión en la superficie celular de CD80 y CD86 (datos no mostrados). El anticuerpo de la presente invención constituye un nuevo producto para evaluar los beneficios terapéuticos de direccionar a las células CD127+ con acción de agotamiento y sin antagonizar ni activar la vía de IL7 ni la vía de TSLP.

La invención se refiere así a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que (i) se une específicamente al dominio extracelular de la cadena alfa del receptor a IL-7 (designado CD127), especialmente de la cadena alfa del receptor de IL-7 expresado por células CD127 positivas humanas, y que opcionalmente presenta actividad citotóxica contra linfocitos T humanos que expresan CD127 (células CD127+), y (ii) no es un antagonista de IL7-R o TSLP-R, en particular no es un antagonista de IL-7 humana o un antagonista de TSLP humana y en particular no inhibe la fosforilación de STAT5 inducida por IL7 y/o no inhibe la producción de TARC (quimiocina del timo y regulada por activación, también denominada CCL17) por células dendríticas humanas derivadas de sangre estimuladas por la TSLP.

La expresión "*se une específicamente*" o cualquier equivalente se refiere a la capacidad del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno de la invención para interactuar con CD127 y unirse con CD127, preferiblemente CD127 humano, mientras que no se unen o se unen con una afinidad de unión significativamente más débil a otras moléculas, en particular a otras proteínas. La unión y la especificidad de unión pueden analizarse mediante SPR (Resonancia de

Plasmón Superficial, por ejemplo, Biacore), ELISA o análisis por transferencia de Western. En una realización particular, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo o las moléculas quiméricas que comprenden dicho anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno se dirigen y se unen a CD127 como una proteína aislada con una constante de disociación (Kd) inferior a 5E-10M, en particular inferior a 3E-10M.

Aunque no se especifica en cada realización divulgada, las propiedades o características definidas de los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y las propiedades o características definidas de los productos elaborados utilizando estos anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos se definen especialmente con respecto a las moléculas citadas cuando estas moléculas son moléculas humanas (tales como CD127, IL-7, TSLP...).

La invención proporciona en particular dos variantes de un anticuerpo, designado Effi3, que comprenden:

- Un dominio variable de cadena pesada designado como Effi3-VH3 o VH3 o Effi3-VHvar3 o VHvar3 (secuencia de la SEQ ID NO: 2 en la Tabla 6, o secuencia de la SEQ ID NO: 8 que incluye un péptido señal), que comprende CDR designadas como VH3-CDR1, VH3-CDR2, VH3-CDR3 o designaciones equivalentes con prefijos Effi3-VH3, Effi3-VHvar3 o VHvar3; y
- ya sea, para la variante designada Effi3-VH3VL3, un dominio variable de cadena ligera designado como Effi3-VH3 o VH3 o Effi3-VHvar3 o VHvar3 (secuencia de la SEQ ID NO: 4 en la Tabla 6, o secuencia de la SEQ ID NO: 10 que incluye un péptido señal), que comprende CDR designadas como VL3-CDR1, VL3-CDR2, VL3-CDR3 o designaciones equivalentes con los prefijos Effi3-VL3, Effi3-VLvar3 o VLvar3;
- o, para la variante designada Effi3-VH3VL4, un dominio variable de la cadena ligera designado Effi3-VL4 o VH3 o Effi3-VLvar4 o VLvar4 (secuencia de la SEQ ID NO: 6 en la Tabla 6, o secuencia de la SEQ ID NO: 12 que incluye un péptido señal), que comprende CDR designadas como VL4-CDR1, VL4-CDR2, VL4-CDR3 o designaciones equivalentes con los prefijos Effi3-VL4, Effi3-VLvar4 o VLvar4.

Dado que VL-CDR2 y VL-CDR3 son idénticos para las cadenas ligeras VL3 y VL4, se designan indistintamente VL3-CDR2, VL4-CDR2 o VL3/4-CDR2 y VL3-CDR3, VL4-CDR3 o VL3/4-CDR3, respectivamente.

El anticuerpo Effi3 se proporciona en particular con los dominios constantes IgG1m E333A (secuencia de la SEQ ID NO: 28) y CLkappa (secuencia de la SEQ ID NO: 34) para las cadenas pesada y ligera, respectivamente. El anticuerpo de la invención está humanizado. En consecuencia, además de las sustituciones en las secuencias de CDR desveladas en el presente documento, los anticuerpos de la invención se modifican en los restos marco de sus secuencias VH y/o VL por sustitución de restos de aminoácidos, en relación con el anticuerpo MD707-3 de rata, en particular, tales restos se modifican para que se correspondan más estrechamente con los anticuerpos humanos de origen natural. La humanización se puede realizar mediante rechapado o mediante injertos de CDR de acuerdo con técnicas conocidas. Ejemplos de sustituciones se desvelan en la sección de Ejemplos. El rechapado se logra especialmente mediante la sustitución de restos de roedores por restos de aminoácidos humanos. La sustitución se realiza de una manera que mantiene la estructura marco del anticuerpo original y también la presentación de las CDR, permitiendo así que las interacciones de los marcos y las CDR en el anticuerpo rechapado preserven la conformación original de la superficie en contacto con el antígeno para que conserve la afinidad de unión al antígeno.

Las siguientes sustituciones dentro de las CDR se introdujeron en el presente anticuerpo, en relación con el anticuerpo de rata MD707-3 (cuya secuencia se describe como la SEQ ID NO: 56 para la cadena pesada y la SEQ ID NO: 57 para la cadena ligera, proporcionando así la referencia para las posiciones de los restos de aminoácidos sustituidos): S30T en VH-CDR1 y E64D en VH-CDR2, definiendo estas dos sustituciones las CDR de Effi3-VH3; L59R en VL-CDR2 y A60D en VL-CDR2, definiendo estas dos sustituciones las CDR de Effi3-VL3. Además de las sustituciones de las cadenas Effi3-VL3, las CDR de la cadena Effi4-VL4 tienen una sustitución S28D adicional en VL-CDR1.

En las realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende o consiste en:

- una cadena pesada con las CDR de la cadena pesada de VH3 desvelada en el presente documento como secuencia de la SEQ ID NO: 2 en la Tabla 6, en particular con VH3-CDR1, VH3-CDR2 y VH3-CDR3 que tienen las secuencias de las SEQ ID NO: 14, 16 y 18, respectivamente, en la Tabla 6; y
- una cadena ligera con las CDR del VL3 o de la cadena ligera del VL4 desveladas en el presente documento como secuencias de la SEQ ID NO: 4 y 6, respectivamente, en particular con VL3-CDR1, VL3-CDR2 y VL3-CDR3 que tienen las secuencias de la SEQ ID NO: 20, 22 y 24 respectivamente, o con VL4-CDR1, VL3-CDR2 y VL3-CDR3 que tienen las secuencias de la SEQ ID NO: 26, 22 y 24 respectivamente.

En una realización particular, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno tiene además la(s) sustitución(es) V101T y/o V102T en VH-CDR3 (CDR3 de la cadena pesada).

En otra realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno adicionalmente no tiene sustitución en las posiciones V101 y/o V102 en VH-CDR3 (CDR3 de la cadena pesada) o no tiene sustitución V101 o V102.

En una realización particular de la invención, el anticuerpo humanizado se caracteriza por la presencia en sus cadenas

VH y/o VL de una o varias de las siguientes sustituciones de restos de aminoácidos adicionales en las posiciones identificadas con respecto a la numeración de Kabat en las regiones marco de las cadenas, con respecto a las secuencias de VH y VL de MD707-3 (el resto indicado es el resultado de la sustitución, el resto de rata original de MD707-3 se desvela en, por ejemplo, las Tablas 1 a 4 en los Ejemplos):

- en la secuencia de VH: en la posición 3 un resto Q, en la posición 15 un resto G, en la posición 16 un resto G, en la posición 21 un resto T, en la posición 80 un resto T, en la posición 87 un resto S, en la posición 91 un resto E, en la posición 95 un resto T, en la posición 118 un resto L, y/o
- en la secuencia de VL: en la posición 7 un resto S, en la posición 9 un resto S, en la posición 11 un resto L, en la posición 12 un resto P, en la posición 18 un resto P, en la posición 47 un resto Q, en la posición 50 un resto K, en la posición 68 un resto S, en la posición 73 un resto G, en la posición 82 un resto R, en la posición 85 un resto A, en la posición 90 un resto T.

En realizaciones particulares en las que el anticuerpo de la invención tiene la sustitución S28D en VL-CDR1 (es decir, tiene la VL-CDR1 de VL4, con la secuencia de la SEQ ID NO: 26), el anticuerpo tiene al menos la sustitución de marco E73G desvelada anteriormente.

En las realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo de la invención tiene todas las sustituciones marco de restos desvelados anteriormente en la cadena pesada. En las realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo de la invención tiene todas las sustituciones marco de restos desvelados anteriormente en la cadena ligera, o todas las sustituciones marco de restos desvelados anteriormente pero para la G en la posición 73, que se conserva como un resto de E. En una realización particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una VL3-CDR1 con la secuencia de la SEQ ID NO: 20 y tiene en la posición 73 un resto E conservado.

En las realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo de la invención tiene (o el fragmento de unión a antígeno comprende):

- una cadena pesada con la secuencia de VH3, es decir, secuencia de la SEQ ID NO: 2; y
- una cadena ligera con la secuencia de VL3 (secuencia de la SEQ ID NO: 4) o de VL4 (secuencia de la SEQ ID NO: 6).

Estas características relacionadas con las llamadas "posiciones humanizadas" se pueden combinar con cualquiera o todas las realizaciones de la definición de los anticuerpos de la invención.

En una realización particular de la invención, los anticuerpos de la invención o sus fragmentos de unión a antígeno dirigidos contra la molécula CD127 presente en el receptor de IL-7 tienen además la propiedad de ser citotóxicos contra células humanas, especialmente linfocitos T humanos que expresan dicho receptor y en una realización preferida contra linfocitos T tumorales.

En una realización particular de la invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se dirigen y se unen a la misma cadena alfa de IL7-R cuando se combina con el receptor de TSLP (también conocido como CCRF2; Número de registro AF338733) como receptor para la TSPT (Reche PA et al., 2001).

Un "*fragmento de unión a antígeno*" de un anticuerpo de la invención es una parte del anticuerpo, es decir, una molécula correspondiente a una porción de la estructura del anticuerpo de la invención que presenta capacidad de unión a antígeno para la cadena alfa del receptor de IL-7 para la IL-7 humana, posiblemente en su forma original; dicho fragmento especialmente presenta la misma o sustancialmente la misma especificidad de unión a antígeno para dicho antígeno en comparación con la especificidad de unión a antígeno del correspondiente anticuerpo de cuatro cadenas. Ventajosamente, los fragmentos de unión a antígeno tienen una afinidad de unión similar a la correspondiente de los anticuerpos de 4 cadenas. Sin embargo, el fragmento de unión a antígeno que tiene una afinidad de unión a antígeno reducida con respecto a los correspondientes anticuerpos de 4 cadenas también se incluye dentro de la invención. La capacidad de unión al antígeno puede determinarse midiendo la afinidad del anticuerpo y del fragmento considerado. Estos fragmentos de unión a antígeno también pueden designarse como fragmentos funcionales de anticuerpos. Los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos son fragmentos que comprenden sus dominios hipervariables designados CDR (regiones determinantes de complementariedad) o parte(s) de ellos que abarca(n) el sitio de reconocimiento del antígeno, es decir, IL-7Ra de IL-7 humana, definiendo así la especificidad de reconocimiento de antígeno. Cada cadena ligera y pesada (respectivamente VL y VH) de una inmunoglobulina de cuatro cadenas tiene tres CDR, designadas VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 y VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, respectivamente.

Así, la invención se refiere a fragmentos de anticuerpos de la invención, que comprenden o consisten en todas las CDR entre VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3 y VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 de VL3 o VL4 y de VH3, respectivamente.

El experto en la materia podrá determinar la ubicación de las diversas regiones/dominios de anticuerpos por referencia a las definiciones estándar expuestas a este respecto, incluyendo un sistema de numeración de referencia (Martin,

2001) Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. En: Antibody Engineering Lab Manual, ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg] o por referencia al sistema de numeración de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª Ed., Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., NIH, 1987) o mediante la aplicación del algoritmo IMGT "collier de perle" (<http://www.imgt.org/IMGTindex/Colliers.html>). A este respecto, Para la definición de las secuencias de la invención, se observa que la delimitación de las regiones/dominios puede variar de un sistema de referencia a otro. En consecuencia, las regiones/dominios definidos en la presente invención abarcan secuencias que muestran variaciones en la longitud de +/- el 10 %, y la localización de las secuencias en cuestión dentro de la secuencia de longitud completa de los anticuerpos puede variar en un +/- 10 %.

En una realización particular de la invención, el anticuerpo humanizado o el fragmento de unión a antígeno del mismo tiene las secuencias de CDR definidas en el presente documento (es decir, las secuencias de CDR de VH3 y de VL3 o VL4, posiblemente con las sustituciones adicionales V101T y/o V102T en VH-CDR3), y además comprende en sus regiones marco, en las posiciones determinadas de acuerdo con la numeración de Kabat, Uno o varios de los siguientes restos de aminoácidos:

- en la secuencia de VH: en la posición 3 un resto Q, en la posición 15 un resto G, en la posición 16 un resto G, en la posición 21 un resto T, en la posición 80 un resto T, en la posición 87 un resto S, en la posición 91 un resto E, en la posición 95 un resto T, en la posición 118 un resto L,

- en la secuencia de VL: en la posición 7 un resto S, en la posición 9 un resto S, en la posición 11 un resto L, en la posición 12 un resto P, en la posición 18 un resto P, en la posición 47 un resto Q, en la posición 50 un resto K, en la posición 68 un resto S, en la posición 73 un resto G o un resto E, en particular un resto E, en la posición 82 un resto R, en la posición 85 un resto A, en la posición 90 un resto T.

La posición de los residuos mencionados anteriormente en los marcos del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo también se puede recuperar de las secuencias de los dominios variables MD707 de las cadenas pesada y ligera como se desvela en la SEQ ID NO: 56 (VH) y la SEQ ID NO: 57 (VL).

En otra realización, el anticuerpo humanizado o el fragmento de unión a antígeno del mismo tiene las secuencias de CDR definidas en el presente documento (es decir, las secuencias de CDR de VH3 y de VL3 o VL4), y comprende además en sus regiones marco, en las posiciones determinadas de acuerdo con la numeración de Kabat, uno o varios de los siguientes restos de aminoácidos, en particular todos ellos:

- en la secuencia de VH: en la posición 3 un resto Q, en la posición 15 un resto G, en la posición 16 un resto G, en la posición 21 un resto T, en la posición 80 un resto T, en la posición 87 un resto S, en la posición 91 un resto E, en la posición 95 un resto T, en la posición 118 un resto L,

- en la secuencia de VL: en la posición 7 un resto S, en la posición 9 un resto S, en la posición 11 un resto L, en la posición 12 un resto P, en la posición 18 un resto P, en la posición 47 un resto Q, en la posición 50 un resto K, en la posición 68 un resto S, en la posición 73 un resto G o un resto E, en particular un resto E, en la posición 82 un resto R, en la posición 85 un resto A, en la posición 90 un resto T.

En realizaciones particulares en las que el anticuerpo humanizado o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un resto D en la posición 28 (en VL-CDR1, como en VL4-CDR1), dicho anticuerpo o fragmento comprende un resto G en la posición 73 (en los restos marco de VL).

En realizaciones particulares en las que el anticuerpo humanizado o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un resto S en la posición 28 (en VL-CDR1, como en VL3-CDR1), dicho anticuerpo o fragmento comprende un resto E en la posición 73 (en los restos marco de VL).

En las realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene todos los restos indicados anteriormente en la posición marco indicada en su cadena pesada. En las realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo tiene todos los restos indicados anteriormente en la posición marco indicada en su cadena ligera, o tiene todos los restos indicados anteriormente en la posición marco indicada, pero para la posición 73 en su cadena ligera donde se encuentra un resto de E.

Basado en la estructura de las inmunoglobulinas de cuatro cadenas, los fragmentos de unión a antígeno pueden definirse, por lo tanto, por comparación con secuencias de anticuerpos en las bases de datos disponibles y en la técnica anterior (Martin, 2001), y especialmente por comparación de la ubicación de los dominios funcionales en estas secuencias, teniendo en cuenta que las posiciones del marco y los dominios constantes están bien definidas para varias clases de anticuerpos, especialmente para las IgG, en particular para las IgG de mamíferos. Dicha comparación también implica datos relacionados con estructuras 3-dimensionales de anticuerpos.

Con fines ilustrativos de realizaciones específicas de la invención, los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo que contienen los dominios variables que comprenden las CDR de dicho anticuerpo abarcan Fv, dsFv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ que están bien definidos con referencia a Kabat (NIH 1987), Martin ACR et al. y también Roitt I. et al. (Fundamental and Applied Immunology MEDSI/McGraw-Hill). Los fragmentos Fv consisten en los dominios VL y VH

de un anticuerpo asociado entre sí por interacciones hidrófobas; en fragmentos dsFv, el heterodímero VH:VL está estabilizado por un enlace disulfuro; en fragmentos scFv, los dominios VL y VH están conectados entre sí a través de un enlazador peptídico flexible, formando así una proteína monocatenaria. Los fragmentos Fab son fragmentos monoméricos que pueden obtenerse mediante la digestión con papaína de un anticuerpo; comprenden la cadena L completa y un fragmento VH-CH1 de la cadena H, unidos entre sí a través de un enlace disulfuro. El fragmento F(ab')₂ puede producirse por digestión con pepsina de un anticuerpo por debajo de la bisagra de disulfuro; comprende dos fragmentos Fab', y adicionalmente una porción de la región de bisagra de la molécula de inmunoglobulina. Los fragmentos Fab' se pueden obtener a partir de fragmentos F(ab')₂ cortando un enlace disulfuro en la región de la bisagra. Los fragmentos F(ab')₂ son divalentes, es decir, comprenden dos sitios de unión a antígeno, como la molécula de inmunoglobulina natural; por otro lado, Fv (un atenuador de VHVL que constituye la parte variable de Fab), dsFv, scFv, Fab, y los fragmentos Fab' son monovalentes, es decir, comprenden un solo sitio de unión a antígeno (para una revisión, véase (Chan y Carter, 2010).

Por consiguiente, la invención se refiere a fragmentos de unión a antígenos que abarcan las secuencias que se desvelan en el presente documento y que son fragmentos monovalentes o divalentes con respecto al reconocimiento de antígenos y son los siguientes:

- Fragmento Fv que consiste en las cadenas VL y VH asociadas entre sí por interacciones hidrófobas;
- Fragmento dsFv en el que el heterodímero VH:VL está estabilizado por un enlace disulfuro;
- Fragmento scFv en el que las cadenas VL y VH están conectadas entre sí a través de un enlazador peptídico flexible, formando así una proteína monocatenaria;
- Fragmento Fab que es un fragmento monomérico que comprende la cadena L completa y un fragmento VH-CH1 de la cadena H, unidos entre sí a través de un enlace disulfuro;
- Fragmento Fab';
- Fragmento F(ab')₂ que comprende dos fragmentos Fab', y adicionalmente una porción de la región de bisagra de un anticuerpo.

Estos fragmentos básicos de unión a antígeno de la invención se pueden combinar entre sí para obtener fragmentos multivalentes de unión a antígeno, tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos. Estos fragmentos de unión a antígeno multivalentes también son parte de la presente invención.

Varias investigaciones para desarrollar anticuerpos terapéuticos han llevado a diseñar las regiones Fc para optimizar las propiedades de los anticuerpos, lo que permite la generación de moléculas que se adaptan mejor a la actividad farmacológica requerida de ellos (Strohl, 2009). La región Fc de un anticuerpo media su semivida sérica y sus funciones efectoras, tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis de células dependientes de anticuerpos (ADCP). Varias mutaciones ubicadas en la zona de contacto entre los dominios CH2 y CH3, como T250Q/M428L (Hinton et al., 2004) y M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F (Vaccaro et al., 2005), han demostrado que aumentan la afinidad de unión a FcRn y la semivida de IgG1 *in vivo*. Sin embargo, no siempre existe una relación directa entre el aumento de la unión a FcRn y la semivida mejorada (Datta-Mannan et al., 2007). Un enfoque para mejorar la eficacia de un anticuerpo terapéutico es aumentar su persistencia en el suero, permitiendo así mayores niveles de circulación, la administración menos frecuente y dosis reducidas. Las regiones de Fc diseñadas pueden ser deseadas para reducir o aumentar la función efectora del anticuerpo. Para los anticuerpos que se dirigen a las moléculas de la superficie celular, especialmente aquellos en células inmunitarias, es necesario anular las funciones efectoras. Por el contrario, para los anticuerpos destinados para su uso oncológico, el aumento de las funciones efectoras puede mejorar la actividad terapéutica. Los cuatro isotipos de IgG humanos se unen a los receptores FcY activadores (FcYRI, FcYRIIa, FcYRIIb, FcYRIIIa), el receptor inhibidor de FcYRIIb y el primer componente del complemento (C1q) con diferentes afinidades, produciendo funciones efectoras muy diferentes (Bruhns et al., 2009). La unión de IgG a los FcYR o Clq depende de los restos ubicados en la región de bisagra y el dominio CH2. Dos regiones del dominio CH2 son críticas para la unión de FcYR y Clq, y tienen secuencias únicas en IgG2 e IgG4 (Armor et al., 1999) (Shields et al., 2001) (Idusogie et al., 2000) (Steurer et al., 1995) (Lazar et al., 2006) (Ryan et al., 2007) (Richards et al., 2008) (Labrijn et al., 2009).

En realizaciones particulares, el anticuerpo de la invención tiene los siguientes dominios constantes:

para la cadena pesada, el dominio constante IgG1m-E333A (secuencia de la SEQ ID NO: 28 en la Tabla 6) o los dominios IgG4m-S228P (secuencia de la SEQ ID NO: 30) o IgG2b (secuencia de la SEQ ID NO: 32);

para la cadena ligera, el dominio constante CLkappa (secuencia de la SEQ ID NO: 34) o el dominio CLlambd (secuencia de la SEQ ID NO: 36).

El anticuerpo de la invención, en particular, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo monoclonal. Las células humanas que expresan CD127 como una cadena del receptor IL-7, que son el objetivo de los anticuerpos de la invención y sus fragmentos, son principalmente linfocitos T y, más precisamente, son subpoblaciones de linfocitos T efectoras, incluidos los linfocitos T sin exposición previa y de memoria, pero no son linfocitos T reguladores, especialmente no son los Treg naturales restantes. Los linfocitos T de memoria se generan como resultado del tratamiento previo con antígenos y se definen principalmente por sus características funcionales, incluida la capacidad

de experimentar una proliferación de recuerdo tras la reactivación y la diferenciación en células efectoras y de memoria secundarias.

Según una realización de la invención, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que tienen "actividad citotóxica contra los linfocitos T" o las propiedades citotóxicas (anticuerpos citotóxicos) provocan el agotamiento de la población de linfocitos T efectores al eliminar estas células y, en consecuencia, reducir el número de estas células cuando se administran. Por el contrario, estos anticuerpos no alteran la subpoblación de linfocitos T reguladores o no la alteran de manera significativa, permitiendo que los linfocitos Treg realicen su función.

De acuerdo con una realización particular de la invención, los anticuerpos citotóxicos presentan citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). El potencial de ADCC del anticuerpo se consideró positivo cuando la citotoxicidad específica fue superior al 5 %.

En realizaciones particulares, el anticuerpo de la invención comprende una cadena pesada con el dominio constante de IgG1 humana, con la mutación E333A, es decir, la secuencia de la SEQ ID NO: 28 (en la Tabla 6). En realizaciones particulares, el anticuerpo de la invención comprende una cadena ligera con el dominio constante CLkappa de IgG1 humana, con la secuencia de la SEQ ID NO: 34.

En realizaciones particulares, el anticuerpo de la invención tiene una cadena pesada desvelada en el presente documento como Effi3_VH3_IgG1m (E333A) con la secuencia de la SEQ ID NO: 42. En realizaciones particulares, el anticuerpo de la invención tiene una cadena ligera desvelada en el presente documento como Effi3_VL3_Clkappa con la secuencia de la SEQ ID NO: 50, o tiene una cadena ligera desvelada en el presente documento como Effi3_VL4_Clkappa, con la secuencia de la SEQ ID NO: 48.

Las propiedades de ADCC se pueden evaluar en un ensayo de ADCC, como el ensayo descrito en los Ejemplos. Cuando el anticuerpo es un anticuerpo de rata, las células efectoras utilizadas en el ensayo de ADCC son células LAK (citotóxicas activadas por linfocinas) de rata. Cuando los anticuerpos se humanizan, el ensayo de ADCC se puede llevar a cabo en células NK humanas.

De acuerdo con otra realización, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo dentro del marco de la invención no es un antagonista de IL7 y/o no es un antagonista de TSLPR. Un "antagonista de IL-7R" significa que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, que se dirigen al IL-7Ralfa, tienen el efecto de prevenir la accesibilidad del receptor de IL-7 expresado en células CD127, especialmente los linfocitos T efectores humanos, en particular los linfocitos T de memoria humanos, para su miembro de unión IL-7, especialmente la IL-7 humana, mientras que los anticuerpos o fragmentos en sí mismos no activan la señalización por el receptor IL7-R. La misma definición se aplica de manera similar a "antagonistas del TSLPR", que se unen a TSLPR, evitan la unión del ligando y no activan la señalización. De acuerdo con una realización particular de la invención, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo dentro del marco de la invención no es un "antagonista de CD127", lo que significa que no es un antagonista de IL-7 ni un antagonista de TSLP. A este respecto, el no antagonismo con respecto a IL-7 y TSLP puede definirse como una combinación de cualquier realización proporcionada en lo sucesivo, en el presente documento, como las realizaciones particulares para la definición de no ser un antagonista de IL-7R o no ser un antagonismo de TSLP. As un resultado de no ser un antagonista del receptor de IL-7, al contrario de los anticuerpos de la técnica anterior, el anticuerpo de la invención o su fragmento funcional no lleva a una fuerte linfopenia debido a la prevención de la generación de linfocitos T tímicos dependientes de IL-7. Una prueba para la medición de las propiedades antagonistas de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos de la invención se describe en los Ejemplos. En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es un antagonista de CD127. En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es un antagonista de la IL7-R. En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención es un antagonista de TSLPR.

En realizaciones particulares, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, no reduce la producción de TARC de células dendríticas estimuladas con TSLP cuando se administra. En realizaciones particulares, la producción de TARC en células dendríticas estimuladas con TSLP, en particular en las condiciones descritas en la sección de ejemplos, se reduce en no más del 20 %, preferentemente no más del 10 % e incluso más preferentemente no más del 5 % en presencia de anticuerpos a una concentración de 5 µg/ml o más (o en presencia de una concentración equivalente de fragmento de unión a antígeno), y/o se reduce en no más del 80 %, preferentemente no más del 50 %, más preferentemente no más del 25 % y aún más preferentemente no más del 10 % en presencia de anticuerpos en concentraciones de 25 µg/ml o más (o en presencia de una concentración equivalente de fragmento de unión a antígeno).

En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no inhibe la señalización de STAT-5 de la IL7-R inducida por la IL-7. En realizaciones particulares, la fosforilación de STAT-5 en células estimuladas con IL-7, en particular en las condiciones descritas en la sección de ejemplos, se reduce en no más del 30 %, preferentemente en no más del 25 % y aún más preferentemente en no más del 20 % en presencia de anticuerpos a una concentración de 0,1 µg/ml o más y preferentemente a una concentración de 0,5 µg/ml o más (o en presencia de una concentración equivalente de fragmento de unión al antígeno) y/o se reduce en no más del 50 %,

preferentemente en no más del 35 % y aún más preferentemente en no más del 20 % en presencia de anticuerpos en una concentración de 1 µg/ml o más (o en presencia de una concentración equivalente de fragmento de unión a antígeno) y/o se reduce en no más del 90 %, preferentemente en no más del 70 %, más preferentemente en no más del 50 % e incluso más preferentemente en no más del 20 % en presencia de anticuerpos en una concentración de 5 µg/ml o más y preferentemente en una concentración de 10 µg/ml o más (o en presencia de una concentración equivalente de fragmento de unión a antígeno).

Los anticuerpos contra el dominio extracelular del receptor de IL7 (o TSLPR), y en particular de CD127, pueden actuar como agonistas del IL7-R (o la TSLPR), es decir, pueden competir con la unión del ligando, mientras que su unión puede llevar a la activación de la totalidad o parte de las vías de señalización de la IL7-R (o TSLPR) en ausencia de ligando y/o a un aumento de la activación en presencia de ligando. En realizaciones particulares, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención no es un agonista de CD127. En realizaciones particulares, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención no es un agonista de la IL7-R. En realizaciones particulares, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención no es un agonista de la TSLPR. En una realización particular, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de la invención no es un agonista de la vía de IL-7 ni un agonista de la vía de TSLPR.

En realizaciones particulares, el anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, no aumenta la producción de TARC de células dendríticas estimuladas con TSLP cuando se administra. En realizaciones particulares, la producción de TARC en células dendríticas estimuladas con TSLP, en particular en las condiciones descritas en la sección de ejemplos, se incrementa en no más del 60 %, y más preferentemente en no más del 50 % en presencia de anticuerpos en una concentración de 0,2 µg/ml o más, preferentemente a una concentración de 1 µg/ml o más y más preferentemente en presencia de 25 µg/ml o más (o en presencia de una concentración equivalente de fragmento de unión a antígeno). En realizaciones particulares, el anticuerpo y el fragmento de unión a antígeno de la invención no inducen la producción de TARC en células en ausencia de TSLP, en particular, la producción de TARC en presencia de las concentraciones anteriores de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y en ausencia de TSLP es del 35 % o menos, preferentemente el 20 % o menos, y más preferentemente el 10 % o menos, de eso en presencia de TSLP y en ausencia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no aumenta la señalización de STAT-5 del IL7-R inducida por la IL-7. En realizaciones particulares, la fosforilación de STAT-5 en células estimuladas con IL-7, en particular en las condiciones descritas en la sección de ejemplos, aumenta en no más del 20 %, preferentemente en no más del 10 % y aún más preferentemente en no más del 5 % en presencia de anticuerpos a una concentración de 0,1 µg/ml o más, preferentemente a una concentración de 1 µg/ml o más, e incluso más preferentemente en una concentración de 10 µg/ml o más (o en presencia de una concentración equivalente de fragmento de unión a antígeno). En realizaciones particulares, la fosforilación de STAT-5 en ausencia de IL-7 y en presencia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en las concentraciones anteriores es del 20 % o menos, preferentemente el 10 % o menos y aún más preferentemente el 5 % o menos de dicha fosforilación en presencia de IL-7 y en presencia del anticuerpo (o del fragmento de unión a antígeno).

Los anticuerpos de la técnica anterior que tienen propiedades tanto citotóxicas como antagonistas para células CD127 positivas permiten efectos acumulativos de estas propiedades con respecto al agotamiento de linfocitos T efectores, especialmente de los linfocitos T de memoria especialmente, permitiendo así un mayor agotamiento (agotamiento del conjunto de células CD127+) y la correspondiente reducción en el número de linfocitos T diana. El anticuerpo de la invención induce un menor agotamiento de los linfocitos T CD127 que no induce linfopenia, lo que podría ser un efecto adverso en algunas circunstancias.

La invención también proporciona polinucleótidos que codifican los anticuerpos (y fragmentos) de la invención. Dichos polinucleótidos se desvelan en particular en la Tabla 6. Pueden proporcionarse como polinucleótidos aislados. El experto se dará cuenta de que, debido a la degeneración del código genético, las secuencias de polinucleótidos distintas de las desveladas explícitamente pueden codificar las mismas secuencias de aminoácidos; tales secuencias de polinucleótidos también están incluidas en la presente invención.

En una realización particular, el polinucleótido comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21 y 23, o las secuencias de las SEQ ID NO: 13, 15, 17, 25, 21 y 23, en particular que comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 1 y 3 o las secuencias de las SEQ ID NO: 1 y 5, en particular, que comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 41 y 47 o las secuencias de las SEQ ID NO: 41 y 49.

En una realización particular, la invención se refiere a un vector que comprende el polinucleótido de la invención, El vector puede ser un plásmido adecuado para la transfección de células o puede ser un vector adecuado para la transducción de células, tal como un vector vírico.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede obtenerse, en particular, por síntesis de ADN. Es posible en particular sintetizar el ADNc del anticuerpo deseado y clonar dicho ADNc en un vector apropiado. La síntesis, la clonación y expresión de un anticuerpo (o de un fragmento de unión a antígeno) se puede realizar de acuerdo con métodos comunes en el campo y fácilmente disponibles para el experto.

Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se genera en particular ventajosamente contra una molécula que es el CD127 expresado por linfocitos T humanos, posiblemente derivado de una inmunización bajo la forma de polipéptido natural o molécula recombinante. Preferentemente, el anticuerpo se genera contra un polipéptido que consiste en o que comprende el epítipo con la secuencia ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLE (ID NO: 55 en la Tabla 6).

La inmunización se puede llevar a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en los siguientes ejemplos: La quimera recombinante CD127 Fc (10975-H03H Sino Biological, Beijing, China) se usó para inmunizar ratas como las ratas de la cepa LOU/C IgkIA disponibles en la Universidad de Louvain, Bélgica). Los hibridomas se obtuvieron mediante la fusión de células mononucleares del bazo con el inmunocitoma de rata LOU IR983F, una línea celular no secretante y resistente a azaguanina, de acuerdo con un procedimiento descrito previamente (Chassoux et al., Immunology 1988 65 623-628). Los hibridomas se seleccionaron por primera vez según la capacidad de los anticuerpos monoclonales secretados para unirse a la molécula CD127 recombinante (quimera CD127 Fc; 10975-H03H, Sino Biological, Beijing, China). Después se seleccionaron los hibridomas para determinar la capacidad de sus anticuerpos monoclonales para unirse al CD127 expresado por los linfocitos T humanos.

"Células de hibridoma" de acuerdo con la invención, son las células generadas a partir de la fusión de células productoras de anticuerpos (linfocitos B) de un animal previamente inmunizado con un inmunógeno seleccionado y un miembro de fusión que son células de mieloma que permiten proporcionar inmortalidad a la célula de fusión resultante. Las células de mieloma y las células productoras de anticuerpos (linfocitos B como los esplenocitos) pueden ser del mismo origen, y son células eucariotas, en particular, células de mamíferos del mismo animal. Como alternativa, pueden ser de diferente origen, generando de esta forma un heterohibridoma. Las células de mieloma como el inmunocitoma de rata LOU IR983F, una línea celular no secretora y resistente a la azaguanina, se eligen entre las células que no producen inmunoglobulinas para permitir que el hibridoma preparado segregue solo anticuerpos monoclonales de la especificidad deseada. Se pueden usar otras células adecuadas para promover la ADCC, como las que se describen en las siguientes páginas para la preparación de los anticuerpos a través de la expresión en células recombinantes, en lugar del inmunocitoma de rata. Dichas células son ventajosamente células que tienen una capacidad de fucosilación baja o nula. La preparación del hibridoma adecuado para llevar a cabo la invención se realiza de acuerdo con técnicas convencionales. Las realizaciones se describen en detalle en los Ejemplos de la presente solicitud de las cuales las características desveladas particulares pueden adaptarse a otras células utilizadas como miembros de fusión. Un hibridoma particular desvelado en la presente invención es el MD707-3 depositado bajo el número I-4532 el 28 de septiembre de 2011 en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, París, Francia) en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest. Dicho hibridoma permite la producción de un anticuerpo de rata designado como MD707-3 que se ha modificado de acuerdo con la invención para proporcionar anticuerpos humanizados Effi3.

Los fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo pueden obtenerse a partir del anticuerpo, especialmente al usar la digestión enzimática de acuerdo con técnicas bien conocidas que incluyen la digestión con papaína o pepsina, o usar cualquier técnica de escisión apropiada. Como alternativa, se pueden expresar en células hospedadoras modificadas por recombinación con secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de dichos fragmentos, o pueden sintetizarse, especialmente se pueden sintetizar químicamente.

En consecuencia, los anticuerpos de la invención, incluyendo los anticuerpos modificados, y los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos también pueden prepararse mediante técnicas clásicas de ingeniería genética, como las descritas por Sambrook et al. [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989), y versiones actualizadas].

De acuerdo con la invención, *"unión"* a la proteína IL-7Ra se refiere a una interacción de tipo antígeno-anticuerpo y abarca las propiedades del *"enlace específico"* de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos cuya unión específica significa que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se unen a la proteína IL-7Ra y, además, no se unen o se unen con una afinidad significativamente más débil a otras proteínas (por ejemplo, cadena y del receptor común de citocina). La especificidad de unión y la unión pueden analizarse de acuerdo con los ensayos desvelados en los Ejemplos y, en particular, pueden analizarse mediante ELISA o análisis por transferencia de Western.

En consecuencia, la invención se refiere a las versiones de los polipéptidos VH y VL como se describe anteriormente, que abarcan el péptido señal o no. El péptido señal puede ser necesario durante la preparación de los polipéptidos en las células.

Como la propiedad más significativa de un anticuerpo terapéutico es la actividad, es importante que las sustituciones propuestas durante el rechapado y la desinmunización no afecten a la afinidad o a la estabilidad del anticuerpo. Se ha recopilado una gran cantidad de información en los últimos 20 años sobre la humanización e injerto de las CDR (Jones et al., 1986) (Ewert et al., 2003), las propiedades biofísicas de los anticuerpos (Ewert et al., 2003), la conformación de los bucles de CDR (Chothia y Lesk, 1987) (Al-Lazikani et al., 1997) (North et al., 2011) y para el marco (Vargas-Madrado y Paz-García, 2003) (Honegger et al., 2009), que junto con los avances en el modelado de proteínas (Desmet

et al., 2002) (Almagro et al., 2014) hace posible humanizar y desinmunizar predeciblemente los anticuerpos con afinidad y estabilidad de unión conservada. Sin embargo, por lo general, sigue siendo necesario probar las propiedades deseadas de un anticuerpo con una secuencia modificada. Los ensayos para las características del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno) se describen en el presente documento, en particular en la sección de Ejemplos.

Las secuencias específicas desveladas en el presente documento para, por ejemplo, Effi3_VH3VL3 y Effi3_VH3VL4 se humanizan en gran medida y la humanización adicional en general no se consideraría necesaria, mientras que revertir algunas sustituciones para restaurar los restos originales de rata generalmente no se consideraría ventajoso al menos si se busca un anticuerpo humanizado, en particular para la administración en humanos. En realizaciones particulares, el anticuerpo es humanizado y/o desinmunizado. En realizaciones particulares, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno es adecuado para la administración en humanos, y en particular no induce una reacción inmunitaria adversa en humanos debido a la presencia de secuencias no humanas, o no induce tal reacción a un nivel clínicamente inaceptable.

El experto sabría que, si se buscó alguna mejora de una característica mediante sustituciones en el dominio variante en relación con las secuencias desveladas en la Tabla 6, solo se esperaría que un número limitado de sustituciones proporcione dicha mejora al tiempo que conserva otras características (ya sea que dichas sustituciones tengan o no el efecto de restaurar los aminoácidos originales de la secuencia MD707-3 de rata). Por lo tanto, sería necesario probar un pequeño número de variantes, y se podrían probar fácilmente utilizando los métodos del presente documento y los métodos conocidos por los expertos para conocer las características importantes del anticuerpo, en particular la unión al dominio extracelular de CD127, opcionalmente, la competencia con IL-7 y/o TLSP, el efecto antagonista de CD127, el IL7-R y/o TSLPR, opcionalmente el efecto agonista a estos receptores, el efecto en la fosforilación de STAT-5 y/o la producción de TARC y opcionalmente el efecto citotóxico, en particular, mediado por ADCC. Dichas secuencias variantes están incluidas en la presente invención y comprenden en particular:

- variantes que tienen las secuencias de CDR de VH3 y VL3 o VL4 y en las que las sustituciones en relación con dichas secuencias se limitan a restos marco, en particular en donde menos del 20 % (o menos de 25 restos), preferentemente menos del 10 % (o menos de 12 restos), más preferentemente menos del 5 % (o menos de 6 restos) e incluso más preferentemente 3, 2 o 1 resto(s) de marco está(n) sustituidos con respecto a dichas secuencias;
- variantes que no tienen sustituciones V101T o V102T y en particular variantes que no tienen sustituciones V101 y V102

en donde las variantes preferidas tienen un resto S en la posición 28 en VL-CDR1 (es decir, tiene el VL-CDR1 de VL3, con la secuencia de la SEQ ID NO: 20) y un resto E en la posición 73 en las secuencias marco de VL (como en VL3 con la secuencia de la SEQ ID NO: 4), o un resto D en la posición 28 en VL-CDR1 (es decir, tiene la VL-CDR1 de VL4, con la secuencia de la SEQ ID NO: 26) y un resto G en la posición 73 en las secuencias marco de VL (como en VL4 con la secuencia de la SEQ ID NO: 6).

La invención también se refiere a una molécula quimérica que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo como se define en el presente documento, en donde dicha molécula quimérica es:

- una molécula compleja que tiene una pluralidad de dominios funcionales que colectivamente proporcionan funciones de reconocimiento, unión, anclaje, señalización a dicha molécula, en particular un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende en asociación en una molécula recombinante, en particular en una proteína de fusión, (i) un ectodominio que es un fragmento scFv de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se define en el presente documento (ii) un dominio transmembrana para anclarse en una membrana celular y (iii) un endodominio que comprende al menos un dominio de señalización intracelular.

En una realización particular, la molécula quimérica es una molécula CAR que comprende al menos 2, ventajosamente, al menos 3 dominios de señalización en los que los dominios de señalización permiten colectivamente al menos una de las siguientes propiedades:

- Iniciación de la activación de linfocitos T, tal como el proporcionado por el dominio citoplasmático ζ de CD3
- citotoxicidad mediada por linfocitos T,
- amplificación de la señal de activación de linfocitos T o coestimulación de dicha señal, tal como lo proporcionan los elementos coestimuladores derivados de receptores tales como 4-1BB, CD28 o ICOS u OX40.

La invención también se refiere a una célula que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento o que comprende una molécula quimérica como se define en el presente documento, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se expone como un ectodominio en la superficie de la célula. La célula puede ser ventajosamente un linfocito T, tal como un linfocito T autólogo de un paciente o un linfocito T alogénico.

El dominio de señalización englobado en la molécula quimérica ventajosamente puede provenir de CD3 ζ o de la cadena Y del receptor Fc.

La invención también se refiere al uso de estas moléculas quiméricas tales como las moléculas CAR para dirigirse a los linfocitos T CD127+, en particular los linfocitos T CD127+ tumorales.

5 La invención también se refiere a un método o preparación de receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende las etapas de:

- a. proporcionar un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en particular un fragmento scFv,
- 10 b. recombinar dicho polinucleótido de a) en su extremo C-terminal con polinucleótidos que codifican de N-terminal a C-terminal un dominio transmembrana y al menos uno, en particular, dos dominios de señalización intracelular adecuados para proporcionar señales estimulantes a una célula, en particular a un linfocito T, más particularmente a un linfocito T humano.
- 15 c. expresar la molécula recombinante obtenida en b) en una célula, especialmente en un linfocito T, más particularmente en un linfocito T humano,
- d. seleccionar el receptor de antígeno quimérico producido por sus propiedades después de ponerlo en contacto con una célula que expresa CD127 humano.

20 La invención también se refiere a un método para crear un anticuerpo de la invención que comprende las etapas de inmunizar a un animal no humano, en particular a un mamífero no humano, contra un polipéptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 55 y, en particular, recolectar el suero resultante de dicho animal no humano inmunizado para obtener anticuerpos dirigidos contra dicho polipéptido.

25 En una realización particular del método de creación de un anticuerpo de la invención, se pueden realizar etapas adicionales para evaluar las propiedades de los anticuerpos preparados. Las etapas pueden comprender, en particular, lo siguiente realizado independientemente uno del otro:

- a. ensayar (por ejemplo, según un método descrito en los Ejemplos en las secciones tituladas "Ensayo de unión a IL7R por citofluorometría" y "reconocimiento de rCD127 de Mab anti-h-CD127 evaluado por ELISA") la capacidad de un fragmento de unión a antígeno de tal anticuerpo para unirse al dominio extracelular de CD127, en particular, a un polipéptido que comprende o consiste en el epítipo con la secuencia de la SEQ ID NO: 55,
- 30 b. probar (por ejemplo, según un método descrito en los Ejemplos en la sección titulada "Ensayo de actividad de Phospho Stat5") el efecto de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de tal anticuerpo en la vía de señalización de IL-7,
- 35 c. probar (por ejemplo, según un método descrito en los Ejemplos en la sección titulada "Ensayo de secreción de TARC") el efecto de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de tal anticuerpo en la vía de señalización de TSLP,
- d. probar (por ejemplo, según un método descrito en los Ejemplos en la sección titulada "Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos") la actividad citotóxica, en particular, la actividad ADCC de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de tal anticuerpo;
- 40

El método para crear un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede comprender además la siguiente etapa de selección de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de tal anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de CD127 que presenta al menos una de las siguientes propiedades:

- no es un antagonista de CD127 y no inhibe la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 en células que expresan IL7-R y/o,
- no inhibe la secreción de TARC estimulada por TSLP en células que expresan la TSLP-R y/o,
- 50 - no es un agonista de CD127 y/o,
- no aumenta la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 en células que expresan IL7-R y/o,
- no aumenta la secreción de TARC estimulada por TSLP en células que expresan el TSLP-R.

Una realización particular del método proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente al dominio extracelular de CD127 y no es un antagonista de CD127 y no inhibe la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 en células que expresan IL7-R y no inhibe la secreción de TARC estimulada por TSLP en células que expresan TSLP-R y no es un agonista de CD127 y/o no aumenta la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 en células que expresan IL7-R y no aumenta la secreción de TARC estimulada por TSLP en células que expresan TSLP-R.

60 Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula quimérica, de acuerdo con la invención, con un vehículo farmacéutico, en donde dicha composición farmacéutica comprende además opcionalmente un principio activo diferente.

65 La invención también se refiere a una composición que comprende como principio activo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula quimérica o una célula o un polinucleótido de acuerdo con las definiciones proporcionadas en el presente documento o una composición farmacéutica, 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 linfocitos T CD127+ de memoria, especialmente los linfocitos T de memoria que son CD127+ y CD8+, o que son células CD127+ y CD4+, cuando se administran a un paciente humano.

Una composición de la invención puede comprender además un compuesto adicional que tiene un efecto inmunomodulador terapéutico, en particular sobre células implicadas en alergia o autoinmunidad. Para fines ilustrativos, los inmunomoduladores de interés son otros anticuerpos monoclonales dirigidos a los linfocitos T, tales como anticuerpos anti-CD3, anti-ICOS o anti-CD28 o proteínas recombinantes o anticuerpos dirigidos a células accesorias como los anticuerpos CTLA4lg o anti-CD40.

De acuerdo con otra realización, una composición de la invención puede comprender además los agentes inmunoterapéuticos útiles en el contexto de la invención seleccionados del grupo que consiste en vacunas terapéuticas (vacunas de ADN, ARN o de péptidos), bloqueadores de puntos de control inmunitarios o activadores o inmunconjugados como los conjugados de anticuerpo-fármaco.

Los agentes inmunoterapéuticos que podrían tomar vacunas contra el cáncer desde fenómenos biológicos interesantes para agentes terapéuticos efectivos incluyen: factores de crecimiento de linfocitos T para aumentar el número y repertorio de linfocitos T sin exposición previa, factores de crecimiento para aumentar el número de células dendríticas (CD), agonistas para activar las CD y otras células presentadoras de antígenos (CPA), adyuvantes para permitir y aumentar las vacunas contra el cáncer, agonistas para activar y estimular los linfocitos T, inhibidores del bloqueo del punto de control de linfocitos T, factores de crecimiento de linfocitos T para aumentar el crecimiento y la supervivencia de linfocitos T inmunes, agentes para inhibir, bloquear o neutralizar las células cancerosas y las citocinas inmunosupresoras derivadas de células inmunitarias.

En la técnica se conocen numerosas dianas y bloqueadores o activadores de puntos de control inmunitarios. En el ámbito de la invención, los ejemplos de objetivos, en particular, los bloqueadores de puntos de control inmunitarios o activadores que podrían ser útiles son anti-PDL1, anti-PD1, anti-CTLA4, anti-CD137, anti-Her2, anti-EGFR, anti-CD20, anti-CD19, anti-CD52, anti-CD-137, anti-CD2, anti-CD28, anti-CD40, HVEM, BTLA, CD160, TIGIT, TIM-1/3, LAG-3, 2B4 y OX40.

Por consiguiente, la invención se refiere a medios terapéuticos de combinación que comprenden como principios activos:

- un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, una molécula quimérica, una célula o un polinucleótido, como se define en el presente documento
- al menos un agente terapéutico adicional seleccionado del grupo de agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, agentes de cirugía, agentes inmunoterapéuticos, probióticos y antibióticos,

en donde dichos principios activos se formulan para la terapia separada, simultánea o de combinación, en particular para su uso combinado o secuencial.

La invención se refiere en una realización a un producto de combinación que es adecuado para la administración a un paciente humano que lo necesite, y que comprende como principios activos: (i) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, una molécula quimérica, una célula o un polinucleótido, tal como se define en el presente documento y (ii) un agente inmunoterapéutico adicional, en particular un agente inmunoterapéutico que implica linfocitos T, tales como un linfocito T que lleva una molécula CAR como se define en el presente documento o una molécula CAR que se dirige a un receptor o antígeno celular, tal como, CD19, CD20 CD52 o Her2. En una realización particular, los anticuerpos utilizados son anticuerpos IgG1 y se utilizan como un agente citotóxico.

La invención también se refiere a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula quimérica o una célula o un polinucleótido como se define o ilustra en el presente documento, para su uso como principio activo en un régimen terapéutico combinado o complementario en un paciente que lo necesite.

Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula quimérica o una célula o un polinucleótido de acuerdo con la invención, una composición farmacéutica o una composición como se define en el presente documento se proponen en particular para su uso en un paciente humano para tratar afecciones patológicas influenciadas por respuestas inmunitarias, especialmente por las respuestas de los linfocitos T de memoria. En consecuencia, los inventores propusieron que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, la molécula quimérica según la invención, la composición farmacéutica o la composición tal y como se define en el presente documento se utilizarán para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o alérgicas, en particular trastornos cutáneos alérgicos, trastornos intestinales o para el rechazo de trasplantes o para el tratamiento de la leucemia como la leucemia linfoblástica aguda (por ejemplo, T-ALL) o el linfoma como el linfoma de Hodgkin, o el tratamiento de una enfermedad cancerosa como el 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 linfocitos T, como el linfoma de Sezary, o para el tratamiento de la leucemia linfoblastoide aguda con mutación de ganancia de la vía IL7-R/TSRP,

mesotelioma.

En vista de su actividad particular en la selección de células CD127 positivas y la actividad citotóxica, los anticuerpos de la invención o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos son en particular adecuados para su uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias tales como el asma, fibrosis quística, tos eosinofílica, bronquitis, sarcoidosis, fibrosis pulmonar, rinitis, sinusitis, infecciones víricas crónicas tales como infecciones debidas al VIH, al virus del papiloma, al virus de la hepatitis, enfermedades alérgicas como el asma alérgica, rinosinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, alergias alimentarias, linfoma o leucemia (por ejemplo, pre-B ALL) y enfermedades autoinmunes que implican una respuesta deletérea de tipo Th2 como el lupus, psoriasis, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa, poliartritis reumatoide, diabetes de tipo 1.

La composición o los medios terapéuticos combinados de acuerdo con la invención también son adecuados para su uso en el tratamiento de un paciente que presenta una enfermedad que implica células CD127+, como las citadas anteriormente. En particular, la composición o los medios terapéuticos de combinación de acuerdo con la invención son adecuados para el tratamiento de un paciente que presenta un cáncer con células tumorales CD127 positivas, en particular, un cáncer donde las células CD127+ constituyen un marcador de mal pronóstico, como en el cáncer de pulmón o el mesotelioma.

Por "*tratamiento*" o "*tratamiento terapéutico*", se entiende que las etapas de administración realizadas resultan en la mejora de la afección clínica de un animal o un paciente humano que lo necesite, que sufre de trastornos asociados con las vías de IL-7 y TSLP, es decir, que implica la proliferación o una acumulación de células CD127 positivas o la diferenciación/maduración/proliferación de células en respuesta a TSLP. Dicho tratamiento tiene como objetivo mejorar el estado clínico del paciente animal o humano, eliminando o aliviando los síntomas asociados con el(los) trastorno(s) relacionado(s) con la presencia de estas células, es decir; que implican la proliferación y/o la acumulación de células CD127 positivas o la diferenciación/maduración/proliferación de células en respuesta a TSLP, y/o en una realización preferida, el tratamiento de acuerdo con la invención permite restaurar a la salud.

La invención también se refiere al uso de un anticuerpo anti-CD127 o fragmento de unión a antígeno del mismo como se define en el presente documento en un ensayo de diagnóstico, particularmente en un ensayo de diagnóstico para medicina personalizada, más particularmente en un ensayo de diagnóstico complementario.

La invención también se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*, en particular, un método de diagnóstico adecuado para su uso en medicina personalizada, más particularmente en un diagnóstico complementario, en donde un anticuerpo anti-CD127 de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo se usa para la detección de células CD127+ en una muestra previamente obtenida de un sujeto y opcionalmente para la cuantificación de la expresión de CD127.

En una realización particular, la invención también se refiere al uso de un anticuerpo anti-CD127 de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo en la fabricación de un medicamento adecuado para su uso en un ensayo de diagnóstico, en particular para su uso en medicina personalizada, o en una prueba de diagnóstico complementaria.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-CD127 de la invención o un fragmento de unión a antígeno del mismo se usa en un método de determinación *in vitro* o *ex vivo* de la presencia de células CD127+ en una muestra obtenida previamente de un sujeto.

En una realización particular, este método comprende determinar *in vitro* la expresión y/o el nivel de expresión de CD127, en una muestra biológica de dicho sujeto usando el anticuerpo anti-CD127 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención.

En otra realización, este método comprende determinar la presencia de CD127 como un biomarcador que es predictivo para la respuesta de un sujeto a un tratamiento, en particular, la respuesta de un sujeto diagnosticado con un cáncer en el que dicho método comprende:

- determinar el nivel de expresión de CD127 en una muestra tumoral de un sujeto, en particular con el anticuerpo anti-CD127 o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, y
- comparar el nivel de expresión de CD127 con un valor representativo de un nivel de expresión de CD127 en una población del sujeto que no responde,

en donde un nivel de expresión más alto de CD127 en la muestra de tumor del sujeto es indicativo para un sujeto que responderá al tratamiento.

La determinación del nivel de expresión de acuerdo con el método puede abarcar la cuantificación de la molécula de CD127 en las células de la muestra.

Leyenda de las figuras:

Breve descripción de los dibujos

Figura 1

Ensayo de unión de Effi3 a CD127 por Facs y ELISA. A. Muestra el porcentaje de células CD127 positivas sobre una respuesta a la dosis de la tinción con Effi3. B. Actividad de unión a Effi3. A. Ensayo de actividad de unión, los anticuerpos anti-CD127 se probaron en un ELISA de tipo sándwich: MD707-3 (línea de estrellas), variante Effi3 VH3VL3 (línea de triángulos) y variante Effi3 VH3VL4 (línea de cuadrados).

Figura 2

Ensayo de estabilidad mediante ELISA a lo largo del tiempo a diferentes temperaturas: la figura muestra la absorbancia del anticuerpo Effi3 de DO a 28 y se almacena a TA (línea de triángulos), 4 °C (línea de cuadrados), 37 °C (línea de cruces), -80 °C (línea de estrellas) o descongelado 3 veces a -80 °C (línea de barras).

Figura 3

Efecto de la unión de Effi3 en CD127 después de la estimulación con IL7 o TSLP. A. Inhibición de pSTAT5 + linfocitos T inducidos por IL-7 en respuesta a la dosis de mAb MD707-3 (cuadrados negros), sin efecto del mAb Effi3 (cuadrados blancos) en P-STAT5 dependiente de IL7. B. Efecto de la producción de TARC inducida por TSLP por anticuerpos anti-CD127 humanos. Cuantificación por ELISA de la producción de TARC en el sobrenadante de células dendríticas CD1C+ de sangre humana cultivadas durante 24 horas con 15 ng/ml de TSLP y diferente concentración de anticuerpos anti-CD127 humanos: MD707-3, Effi3 o anticuerpo anti-TSLP como control positivo de inhibición.

Figura 4

Estudio de citotoxicidad de variantes de Effi3, clones humanizados de MD707-3, a diferente concentración y diferente proporción entre células efectoras y células diana. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) después de la incubación con NK humanas como células efectoras (E) de Effi3 H3L3 y Effi3 H3L4 en líneas celulares LAL-T DND41 (CD127 +) de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T marcadas con 51Cr en diferente proporción: (E:T= 30:1; 10:1 y 3:1). El porcentaje de citotoxicidad específica se determinó mediante la liberación de 51Cr.

Figura 5

Secuencia de aminoácido CD127 humano: los aminoácidos en negrita son la secuencia de epítipo lineal reconocida por el anticuerpo Effi3.

Figura 6

Secuencia de aminoácidos (aa) de VH3 de Effi3 con IgG1m: aa en gris: péptido señal, aa en negrita y cursiva: CDR1, CDR2 y CDR3; aa subrayado: región constante de IgG1m; aa en negrita más grande: aa humanizados.

Figura 7

Aminoácido (secuencia de aa de VL4 de Effi3 con la región constante de CLkappa: aa en gris: péptido señal, aa en negrita y cursiva: CDR1, CDR2 y CDR3; aa subrayado: región constante CLkappa; aa en negrita más grande: aa humanizados.

Ejemplos/Material y métodos/Resultados

HUMANIZACIÓN

El clon MD707-3 se humanizó mediante métodos *in silico* de desinmunización y rechapado como se describe anteriormente.

El anticuerpo MD707-3 consiste en la cadena ligera (secuencia de la SEQ ID NO: 57 en la Tabla 6) y la cadena pesada (secuencia de la SEQ ID NO: 56 en la Tabla 6). El análisis del contenido del dominio de MD707-3 mostró que era un Fv, presumiblemente de un anticuerpo IgG1 de longitud completa. Los dominios variables se aislaron y anotaron con definiciones y numeración de CDR de kabat. Se generaron alineaciones de secuencias que comparan los dominios variables de MD707-3 con las líneas germinales humanas. Basándose en la identidad de secuencia general, haciendo coincidir las posiciones de la zona de contacto y las posiciones canónicas de CDR de clase similar, se identificó una familia de línea germinal para cada cadena. Se descubrió que MD707-3 es similar a la línea germinal de cadena ligera KK2-A3 y VH3-3-73 pesada. Se construyeron los modelos estructurales de las secuencias parental y desinmunizada.

Tabla 1. Restos de rechapado

Cadena	Región	Sustitución	Descripción
L	FRI	A7S	La sustitución conservativa de serina por alanina lleva la posición en línea con las líneas germinales humanas más próximas.
L	FRI	L9S	Rechapado que protruye leucina a serina. A pesar de que la leucina se produce en esta posición, es un resto hidrófobo completamente expuesto que se puede sustituir
L	FR1	V11L	La sustitución de leucina por valina en la posición 11 es parte de un gran rechapado y remodelado de FR1, que incluye las posiciones 12 y 18. Las tres sustituciones alterarán la superficie para parecerse a la de las líneas germinales humanas más cercanas. Rechapado de valina a leucina junto con serina a prolina en la posición 12.
L	FR1	S12P	Rechapado de serina a prolina en conjunto con valina a leucina en la posición 11.
L	FR1	S18P	Rechapado de serina a prolina
L	L2	L59R	Tanto la leucina como la arginina están permitidas en la posición. Sin embargo, las líneas germinales humanas más similares tienen todas arginina. Como la posición se encuentra dentro de L2 de CDR e incluso aunque no está implicado en la unión, se mantuvo la leucina en la primera cadena rechapada. La arginina se evaluó en la segunda cadena rechapada.
L	FR3	R68S	Rechapado que protruye la arginina externa a serina
L	FR3	K82R	La sustitución conservativa de arginina por lisina lleva la posición en línea con las líneas germinales humanas más cercanas.
L	FR3	T85A	La sustitución conservativa de alanina por treonina lleva la posición en línea con las líneas germinales humanas más cercanas.
H	FR1	H3Q	La histidina es un residuo extraño, rechapado a glutamina.
H	FR1	K15G	Rechapado externo que protruye glicina por lisina. Sustituir en conjunto con ácido glutámico en posición 16 para la neutralidad de la carga.
H	FR1	E16G	Rechapado extraño que protruye glicina por ácido glutámico. Sustituir en conjunto con lisina en la posición 15 para la neutralidad de la carga.
H	H2	E64D	Sustitución conservativa de ácido aspártico por glutámico para llevar la posición en línea con las líneas germinales humanas más cercanas.
H	FR3	M80T	Rechapado que expuso la metionina hidrófoba a treonina
H	FR3	N87S	Rechapado de asparagina a serina
H	FR3	D91E	Sustitución conservativa de ácido glutámico por aspártico para llevar la posición en línea con las líneas germinales humanas más cercanas.
H	FR3	M95V	El rechapado de superficie expuso la metionina a valina. La treonina también se encuentra con frecuencia en esta posición. Sin embargo, las líneas germinales humanas más cercanas contienen valina.
H	FR4	M118L	El rechapado expuso la metionina hidrófoba a la leucina. La posición debería ser leucina o metionina y la leucina no se puede oxidar.
Las sustituciones de rechapado se han diseñado basándose en este entorno específico y pueden tener un efecto diferente si se realizan en algún otro entorno de la secuencia.			

Tabla 2. Sustituciones desinmunizadas

Cadena	Región	Sustitución	Descripción
L	L1	S28D	La sustitución a ácido aspártico elimina por completo dos epítomos promiscuos. Esta sustitución de CDR se intentó debido a su eficacia en la reducción de la inmunogenicidad predicha. La posición está fuera de la probable zona de contacto de unión. La introducción de una carga aquí sustituiría la pérdida de la carga espacialmente cerca en la posición 73, L.E73G.
L	FR2	K47Q	Sustitución desinmunizante de lisina a glutamina que elimina la unión para los 8 alotipos de HLA-DRB1. La sustitución asegura la neutralidad de la carga conservada cuando se realiza la sustitución Q50K.
L	FR2	Q50K	La sustitución de desinmunización de lisina por glutamina no es eficaz en la reducción de la inmunogenicidad predicha, pero lleva al dominio en línea con el conjunto de restos esperado en la agrupación de la carga localizada en la mitad inferior de los dominios VK. La introducción de la carga se compensa por una sustitución de rechapado en la posición 47.
L	L2	A60D	La posición 60 está en la parte inferior del bucle, lejos de la zona de contacto de unión. El ácido aspártico es aceptable en la posición y es eficaz en la reducción de la inmunogenicidad predicha.
L	FR3	E73G	La posición 73 es comúnmente glicina en los anticuerpos humanos y está cerca de las CDR. El ácido glutámico se debe eliminar tanto por motivos de rechapado como de desinmunización. Sin embargo, debido a la proximidad a las CDR, la sustitución solo se realiza junto con la reintroducción de una carga en la posición 28 espacialmente cercana. La sustitución elimina 4 epítomos promiscuos.
L	FR3	V90T	La sustitución de desinmunización de disolvente expuso la valina a la treonina. La sustitución elimina la unión a 7 alotipos HLA-DRB1
H	FR1	S21T	Sustitución de desinmunización en FR1 que elimina la unión a 9 alotipos HLA-DRB1.
H	FR1	S30T	La posición está cerca a la superficie de contacto de unión. Sin embargo, dada la localización y la dirección, se enfrenta a una sustitución conservativa de desinmunización de serina a treonina que debería evaluarse. La sustitución elimina la unión a 4 alotipos de HLA-DRB1, incluyendo el alotipo común DRB1 *03:01.
H	FR3	M95T	La sustitución de metionina a treonina es más eficaz en la reducción de la inmunogenicidad predicha en comparación con la valina, eliminando la unión a 19 alotipos HLA-DRB1 adicionales.
H	H3	V101T	Las sustituciones en la posición 101 y 102 se centran en eliminar una agrupación de epítomos que abarcan desde FR3 hasta H3. Las sustituciones son eficaces en la reducción de la inmunogenicidad predicha, junto con la eliminación de la unión para 26 alotipos HLA-DRB1. El análisis estructural cuidadoso ha indicado que se podría tolerar la sustitución a treonina con esta cadena lateral ramificada en beta de forma similar.
H	H3	V102T	Sustitución de desinmunización eficaz que se podría tolerar.
Las sustituciones de desinmunización se han diseñado basándose en las secuencias de rechapado y pueden tener un efecto diferente si se realizan en algún otro entorno de la secuencia			

Se han propuesto un total de cuatro cadenas ligeras rechapadas/desinmunizadas y cuatro cadenas pesadas rechapadas/desinmunizadas. Se diseñaron 15 variantes y se han recomendado para su expresión y caracterización *in vitro*.

Tabla 3. Posición conservada en la superficie de contacto VH/VL

Dominio	Posiciones
VL	34, 36, 38, 43, 44, 46, 87, 88, 89, 91, 96, 98
VH	35b*, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95 100-100k**, 101, 103
Todas las posiciones son de acuerdo a la numeración de Kabat	
* La numeración de la posición uno de N-terminal a la posición 36 depende de la longitud del CDR H1:	
** La numeración de la posición uno de N-terminal a la posición 101 difiere según la longitud de CDR H3	

Tabla 4. Posición determinante de CDR de clase canónica

CDR	Restos clave
L1	2, 25, 27b, 27c, 28, 33, 71
L2	34
L3	90, 94, 95, 97
H1	24, 26, 29, 35a**, 94
H2	54, 55, 71
Todas las posiciones son de acuerdo a la numeración de Kabat	
* La numeración de la posición dos de N-terminal a la posición 36 depende de la longitud de CDR H1	

5

Nucleótidos y secuencias de aminoácidos de Mab anti-CD127 humano

Las regiones VH y VL del clon Effi3 se secuenciaron utilizando la tecnología RACE PCR. En resumen, se extrajo el ARN total, se retrotranscribió y el ADNc resultante se poliadeniló en el extremo 3' de las moléculas usando dATP y la enzima transferasa terminal. Se realizó una primera reacción de PCR de 35 ciclos utilizando un cebador de anclaje oligodT y una enzima Herculeasa (Stratagene). Se realizó una segunda PCR de 35 ciclos utilizando cebadores de anclaje de PCR anidada. El producto de la PCR resultante se clonó a continuación en TA en *E. coli* y después de la selección en ampicilina, las colonias resultantes se seleccionaron por perfil de enzimas de restricción y se insertó el ADNc secuenciado

15

Las variantes de Effi3 humanizadas se clonaron en plásmidos pFuse-CHiG o pFuse-CLiG

Clonación de secuencias de mutación humanizada de VH Effi3 en plásmido de expresión pFuseCHiG-hG1e4

El plásmido de expresión pFuseCHiG-hGle4 (Invivogen) contenía el dominio constante CH1 + bisagra + CH2 + CH3 de la IgG1 humana, el cual se modificó para mejorar el efecto citotóxico de ADCC y CDC. Para empezar, solo secuencias de variantes MD707 humanizadas TS, VH3 y VH4 (el anticuerpo más humanizado) se sintetizaron por Genscript, se insertaron en el vector de clonación (pUC57) con los extremos 5' y 3' de EcoRV y la adición de la secuencia Kozak (GCCACC) antes de ATG, se envió (4 µg liofilizado) y se resuspendió en 20 µl de H₂O. Cada plásmido se digirió con la enzima de restricción EcoRV para extraer el inserto de VH (400 pb).

El inserto purificado se ligó en el plásmido de expresión pFuseCHiG-hGle4 abierto en EcoRV y se desfosforiló. Los clones positivos, que tienen fragmentos VH insertados en la orientación correcta antes de los dominios constantes humanos, se amplificaron y purificaron por Midiprep sin endotoxina (Macherey-Nagel) para la etapa de transfección.

30

Clonación de secuencias de mutación humanizada de VL Effi3 en plásmido de expresión pFuseCLiG-hk

El plásmido de expresión pFuseCLiG-hk (Invivogen) contenía el dominio constante CLkappa de la IgG1 humana. Para empezar, solo las secuencias de las variantes de MD707 humanizadas VLts, VL3 y VL4 se sintetizaron por Genscript, se insertaron en el vector de clonación (pUC57) con los extremos 5' y 3' de BsiWI y adición de la secuencia Kozak (GCCACC) antes de ATG, se envió (4 µg liofilizado) y se resuspendió en 20 µl de H₂O. Cada plásmido se digirió con la enzima de restricción BsiWI para extraer el inserto VL (400 pb). El inserto purificado se ligó en el plásmido de expresión pFuseCLiG-hk abierto en BsiWI y se desfosforiló. Los clones positivos, que han insertado fragmentos VL en la orientación correcta antes de los dominios constantes humanos, se amplificaron y se purificaron mediante Midiprep sin endotoxina (Macherey-Nagel) para la etapa de transfección.

40

Co-transfección de variantes de Effi3 humanizadas (VH3 o VH4 y VL3 o VL4) en células de mamífero

Un día antes de la transfección: Se sembraron COS a 100.000 células/pocillo en placa P12 con medio completado (DMEM SVF al 10 % (Hyclone) + PS al 1 % + Glu al 1 %) y se incubaron a 37 °C, con CO₂ al 5 %.

45

El día de la transfección: las células COS deben estar en un 50 a 90 % de confluencia. Se lavaron con PBS y se mantuvieron con 500 µl en medio completo. Se mezclaron 0,6 µg de variante de VH + 0,4 µg de variante de VL en 200 µl de medio OptiMEM y se añadió 1 µl de Reactivo Plus (Invitrogen) (incubación 15 min a temperatura ambiente). Se agregaron 3,5 µl de lipofectamina LTX (Invitrogen) +100 µl en la mezcla y se incubaron 25 minutos a temperatura

50

ambiente. La mezcla completa se depositó gota a gota en células COS y se incubó 48 h al 37 %, con CO₂ al 5 %. Después de 48 h, los sobrenadantes se recolectaron y se centrifugaron (1500 rpm durante 10 min a 4 °C). Para el ELISA de tipo sándwich, el anticuerpo anti-IgG humana en burro (específico de Fc) se recubrió a 1,2 µg/ml en una placa P96 y se agregaron diluciones de sobrenadante para medir la concentración en función del intervalo estándar. Después de la incubación y el lavado, se añadieron anticuerpos anti-cadena ligera humana en ratón (específica para kappa) y anti-ratón marcado con peroxidasa y se revelaron por métodos convencionales. Para el ensayo ELISA de actividad, la hCD127 recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H08H) se inmovilizó sobre plástico a 1 µg/ml y se agregaron diluciones de sobrenadante para medir la unión. Después de la incubación y el lavado, se añadieron anticuerpos anti-cadena ligera humana en ratón (específica para kappa) y anti-ratón marcado con peroxidasa y se revelaron por métodos convencionales. Como control positivo para la transfección, se transfectó un pocillo con GFP-pcDNA3.1 (1 µg/µl) con 1 µg de ADN. Antes de recolectar todos los sobrenadantes, se realizó un control visual con microscopio de fluorescencia de este pocillo de GFP para verificar la positividad. Clásicamente, los presentes inventores obtuvieron aproximadamente entre el 10 % de las células transfectadas con células COS y el 25 % con células CHO.

Se realizaron dos experimentos en células COS y el último en células CHO (sin Reactivo Plus).

Caracterización de variantes secretadas de Effi3 en sobrenadante de transfección con variantes humanizadas

En cada sobrenadante de cotransfección, la concentración de MD707-3 secretada (VH+VL) se midió mediante un ensayo ELISA de tipo sándwich (anticuerpo anti-hFc/anticuerpo anti-hkappa), en función del estándar de lVlgG humana. La unión a CD127 de MD707-3 en cada cotransfección se determinó mediante el ensayo ELISA de actividad (proteína recombinante CD127Fc/anticuerpo anti-hkappa) en comparación con la actividad del estándar MD707-3 químico purificado. Los controles negativos con plásmidos VH o VL solo no tuvieron actividad anti-CD127.

Los resultados mostraron (datos no mostrados), para cadenas ligeras, que VLvar3 y VLvar4 no indujeron la modificación de la actividad de unión en comparación con VLts. No obstante, para cadenas pesadas, VHvar4 (el más humanizado) modificó la unión de Effi7h a la proteína CD127, porque la actividad de DE50 fue muy menos buena con esta cadena que con la otra cadena VHvar3 o VHts. Las mutaciones de VHvar3 no modificaron su unión al receptor.

Finalmente, la combinación de los más humanizados (VHvar4 + VLvar4) perdió completamente su actividad de unión.

No obstante, la secuencia más humanizada que mantuvo su actividad de unión es VHvar3+VLvar3.

Las dos variantes de Effi3 conservadas, con las secuencias más humanizadas que mantuvieron su actividad de unión, fueron:

- Secuencia de VHvar3+VLvar3 de la SEQ ID NO: 2 y secuencia de la SEQ ID NO: 4 (o, con las secuencias de señales, secuencias de las SEQ. ID NO: 8 y 10). Este anticuerpo se designa en el presente documento como VH3VL3
- Secuencia de VHvar3+VLvar4 de la SEQ ID NO: 2 y secuencia de la SEQ ID NO: 6 (o, con las secuencias de señales, secuencias de las SEQ ID NO: 8 y 12). Este anticuerpo se designa en el presente documento como VH3VL4

Ensayo de unión a IL7R por citofluorometría

Para medir la unión de anti-IL7R en PBMC humanas, el anticuerpo se incubó con PBMC humanas durante 30 minutos a 4 °C, y se lavó antes de teñir 30 minutos a 4 °C con anti-CD3 marcado con APC (clon HIT3a, BD Bioscience, ref. 555342) más anti-CD127 marcado con PE (clon hIL7R-M21, BD Bioscience, ref. 557938), que no reaccionan de forma cruzada con el anticuerpo Effi7. Las muestras se analizaron y se clasificaron en células CD3+ en el citofluorómetro BD LSRII.

Reconocimiento de rCD127 de Mab anti-h-CD127 evaluado por ELISA

La actividad de unión del anticuerpo anti hCD127 se evaluó mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Para el ensayo ELISA, la hCD127 recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H08H) se inmovilizó sobre plástico a 1 µg/ml y se añadió anticuerpo purificado para medir la unión. Después de la incubación y el lavado, se añadió anti-cadena kappa de rata en ratón marcado con peroxidasa (AbdSerotec) y se reveló por métodos convencionales.

Tal como se muestra en la figura 1B, la actividad de unión medida por ELISA del anticuerpo Effi3 es alta, con una DE50 = 4 ng/ml para los anticuerpos anti-hCD127 Effi3 H3L4 y Effi3 H3L3 y una DE50 de 3,4 ng/ml para el anticuerpo químico MD707-3.

Ensayo de estabilidad

El anticuerpo humanizado Effi3 (clon VH3VL4) se incubó a 4 °C, 37 °C, a -80 °C o a temperatura ambiente durante 28 días. La actividad de unión se probó mediante ensayo ELISA, la hCD127 recombinante (Sino Biologicals, Beijing, China; referencia 10975-H08H) se inmovilizó sobre plástico a 1 µg/ml y se agregaron diluciones de sobrenadante para medir la unión. Después de la incubación y el lavado, se añadieron los anticuerpos anti-cadena ligera humana (específica de kappa) en ratón y anti-ratón en burro marcado con peroxidasa y se revelaron mediante métodos convencionales. Se agregaron dosis mayores de Mab para medir la unión. Después de la incubación y el lavado, se añadió anti-cadena kappa de rata en ratón marcado con peroxidasa (AbdSerotec) y se reveló por métodos convencionales.

Resultados de la Figura 1 B. muestran que Effi3 purificado es estable a lo largo del tiempo y después de diferentes temperaturas de almacenamiento.

Ensayo de actividad de Phospho Stat5

Las células monocíticas de sangre periférica (PBMC) recolectadas en gradiente de ficoll de voluntarios sanos se incubaron en medios sin suero con diferentes concentraciones de anticuerpos de interés durante 15 minutos a temperatura ambiente, antes de la incubación con 0,1 o 5 ng/ml de IL-7 humana recombinante (rhIL-7; AbD Serotec ref PHP046) durante 15 minutos a 37 °C. Las PBMC sin tratar con rhIL-7 se analizaron como la señal de fondo, mientras que las células tratadas con IL-7 sin anticuerpo se establecieron como control negativo. Las PBMC se enfriaron rápidamente y se lavaron con tampón FACS para detener la reacción. Las células se incubaron luego durante 15 minutos con una solución fría de Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience, ref. 554722), se lavaron dos veces con tampón Perm/Wash (Bd Bioscience) y se tiñeron con un anticuerpo anti-CD3 FITC humano (Bd Bioscience ref. 557694) durante 30 minutos sobre hielo. Las PBMC se lavaron luego dos veces con tampón Perm/Wash y se permeabilizaron en BD Perm Buffer III (Bd Bioscience, ref. 558050) durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces en tampón FACS (y/o PBS con BSA al 1 % y azida al 0,1 %) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-pSTAT5 humano Alexa 647 (BD Bioscience, ref 612599). Las muestras se analizaron en el instrumento BD CANTO II FACS. Como se muestra en la Figura 3 A., el anticuerpo Effi3 (variante VH3VL4) derivado del anticuerpo MD707-3, ya no tiene actividad inhibitoria de la fosforilación de STAT5 en comparación con el anticuerpo parental MD707-3.

Ensayo de secreción TARC

Se aislaron células dendríticas (CD) mieloides con CD1c (BDCA-1) + kit de aislamiento de células dendríticas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) de sangre de voluntarios sanos (Etablissement Français du Sang, Nantes, Francia). Las células dendríticas mieloides se cultivaron en RPMI que contenía un 10 % de suero de ternera fetal, piruvato al 1 %, Fiepes al 1 %, L-glutamina al 1 % y penicilina-estreptomina al 1 %. Las células se sembraron a 5.104 células/pocillo en placas planas de 96 pocillos, en presencia de TSLP (15 ng/ml), LPS (1 µg/ml) o medio de cultivo solo, y adición de diferentes anticuerpos CD127 humanos (MD707-3, Effi3-VH3VL4) o anticuerpo anti-TSLP en diferentes concentraciones. A las 24 horas de cultivo, los sobrenadantes se recogieron y se analizaron para determinar la producción de TARC mediante el ensayo ELISA (R&D systems, Mineápolis, EE.UU.).

La inhibición de la producción de TARC inducida por TSLP se evaluó midiendo dicha producción como se describió anteriormente en ausencia de anticuerpo o en presencia de MD707-3 o Effi3 o anticuerpo comercial anti-TSLPR (R&D systems ref. AF981) a 0,2, 1, 5 o 25 µg/ml. Como se muestra en 3 B., Effi3 ya no inhibió la producción de TARC inducida por TSLP en comparación con su anticuerpo parental MD707-3 y el anticuerpo de control positivo anti-TSLP.

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

La ADCC de los Mab anti-CD127 humanos se refiere a la unión de un anticuerpo a un epítipo expresado en células diana y al posterior reclutamiento dependiente de Fc de células inmunitarias efectoras que expresan receptores Fc (esencialmente células NK y linfocitos activados), dando como resultado la destrucción de células diana principalmente por mecanismos basados en granzima/perforina.

Para el uso del anticuerpo en su formato original (rata), las células efectoras eran células citolíticas activadas por linfocina (LAK) generadas a partir de células de bazo cultivadas con 1000 U/ml de IL-2 (Roche, Basilea, Suiza) en frascos de cultivo tisular (Corning Glass Works, Corning, NY).

Cuando se humanizó el anticuerpo, las células efectoras eran células NK humanas primarias nuevas aisladas de células mononucleares de sangre periférica mediante selección negativa utilizando perlas magnéticas (kit de aislamiento NK, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) utilizando un instrumento de clasificación de células AutoMACS. Las células NK se incubaron durante la noche a 37 °C, con CO₂ al 5 %, en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, California) complementado con FBS al 10 % (Life Technologies), 100 UI/ml de penicilina (Life Technologies), 0,1 mg/ml de estreptomina (Life Technologies), L-glutamina 2 mM (Life Technologies) y 150 UI/ml de IL-2 humana (Roche, Basel, Suiza).

Las células diana se marcaron con 100 µCi (3,7 MBq) de ⁵¹Cr (PerkinElmer) durante 1 h a 37 °C y se lavaron tres

veces con medio de cultivo. Las células diana se incubaron con anticuerpos diluidos o con excipiente (medio de cultivo) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se colocaron 10.000 células en una placa de 96 pocillos con fondo en U. Se agregaron linfocitos efectores a la proporción de células E:D (efectoras:diana) indicada (volumen final: 200 µl) durante un período de incubación de 4 horas a 37 °C. Después se recolectó un total de 25 µl del sobrenadante y se contó en un contador gamma (Packard Instrument). El porcentaje de citotoxicidad específica se determinó mediante la liberación de ⁵¹Cr.

Los resultados presentados en la Figura 4, muestran que los anticuerpos de las variantes Effi3 H3L4 y H3L3 indujeron ADCC, de una manera dependiente de la dosis.

Perfil de anticuerpos utilizando micromatrices de péptidos

Las micromatrices de péptidos de PepStar™ Technologies comprenden péptidos sintéticos purificados derivados de antígenos u otras fuentes que se inmovilizan de forma quimioselectiva y covalentemente sobre una superficie de vidrio. Se inserta un resto enlazador hidrófilo optimizado entre la superficie del vidrio y la secuencia peptídica derivada del antígeno para evitar falsos negativos causados por un impedimento estérico. Por razones técnicas, todos los péptidos contienen una glicina en C-terminal. Los experimentos de perfilado de muestras se realizaron en una biblioteca de péptidos que consiste en 52 péptidos. La lista completa de péptidos se muestra a continuación:

Tabla 5. Lista de péptidos utilizados en ensayos de micromatrices de péptidos

Nb	Secuencia	Nb	Secuencia	Nb	Secuencia
58	ESGYAQNGDLEDAEL	76	FIETKKFLLIGKSNI	94	HDVAYRQEKDENKWT
59	AQNGDLEDAELDDYS	77	KKFLLIGKSNICVKV	95	YRQEKDENKWTHVNL
60	DLEDAELDDYSFSCY	78	LIGKSNICVKVGEKS	96	KDENKWTHVNLSTK
61	AELDDYSFSCYSQLE	79	SNICVKVGEKSLTCK	97	KWTHVNLSTKLTLL
62	DYSFSCYSQLEVNGS	80	VKVGEKSLTCKKIDL	98	VNLSTKLTLLQKRL
63	SCYSQLEVNGSQHSL	81	EKSLTCKKIDLTIV	99	STKLTLLQKRLQPA
64	QLEVNGSQHSLTCAF	82	TCKKIDLTIVKPEA	100	TLLQKRLQPAAMYEI
65	NGSQHSLTCAFEDPD	83	IDLTIVKPEAPFDL	101	RKLQPAAMYEIKVRS
66	HSLTCAFEDPDVNTT	84	TIVKPEAPFDLSVIY	102	PAAMYEIKVRSIPDH
67	CAFEDPDVNTTNLEF	85	PEAPFDLSVIYREGA	103	YEIKVRSIPDHYFKG
68	DPDVNTTNLEFEICG	86	FDLSVIYREGANDFV	104	VRSIPDHYFKGFWSE
69	NTTNLEFEICGALVE	87	VIYREGANDFVVTFN	105	PDHYFKGFWSEWSPS
70	LEFEICGALVEVKCL	88	EGANDFVVTFNTSHL	106	FKGFWSEWSPSYFR
71	ICGALVEVKCLNFRK	89	DFVVTNTSHLQKKY	107	WSEWSPSYFRTPEI
72	LVEVKCLNFRKLQEI	90	TFNTSHLQKKYVKVL	108	SPSYFRTPEINNSS
73	KCLNFRKLQEIYFIE	91	SHLQKKYVKVLMHDV	109	YFRTPEINNSSGEMD
74	FRKLQEIYFIETKKF	92	KKYVKVLMHDVAYRQ		
75	QEIYFIETKKFLLIG	93	KVLMHDVAYRQEKDE		

Se incubaron un total de 9 muestras en portaobjetos de micromatrices utilizando un formato Multiwell. Para el anticuerpo N13B2 y las otras muestras, se aplicaron 4 concentraciones diferentes (10, 1, 0,1 y 0,01 µg/ml). Se realizó una incubación de control negativo (solo anticuerpo secundario) en paralelo. Las proteínas IgG humanas y de ratón se coinmovilizaron junto con cada conjunto de péptidos para servir como controles de ensayo. Todas las incubaciones se realizaron en paralelo utilizando dos portaobjetos. Se usaron minimatrices de dos péptidos en cada portaobjetos como incubación de control aplicando el anticuerpo de detección marcado con fluorescencia solo para evaluar la unión de falsos positivos a los péptidos. Después de lavar y secar los portaobjetos, se escanearon con un escáner láser de alta resolución a 635 nm para obtener imágenes de intensidades de fluorescencia. Las imágenes se cuantificaron para obtener un valor de píxel medio para cada péptido. Anticuerpo secundario anti-IgG de rata (JIR 212-175-082) marcado con Cy5 a 1 µg/ml. Tampones y soluciones. El tampón utilizado fue el tampón TBS que incluía Tween20 al 0,05 % (JPT) y un tampón de ensayo T20 (Pierce, SuperBlock TBS T20, n.º 37536). La adquisición y el análisis se realizaron utilizando micromatrices de péptidos (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania; lote n.º 2668, cámara de incubación de multipocillo, Axon Genepix Scanner 4200AL, Software de reconocimiento de puntos GenePix y Microsoft Excel.

El resultado presentado en la Figura 5 muestra J 7, la secuencia del epítipo lineal que es reconocida por el anticuerpo Effi3 en CD127.

La siguiente tabla (Tabla 6) describe la secuencia descrita en el presente documento. "Nb" significa la SEQ ID NO de cada secuencia; "Tipo" desvela la naturaleza de la secuencia, bien sea la secuencia de ADN o de aminoácidos (PRT) y "long" representa la longitud de la secuencia.

Nb	Nombre	Tipo	Secuencia	Long
1	Effi3 VHvar3	ADN	GCTGTGCAACCGAGCCATGTACTGGGTGGGAGAGGCTCTGTGAAATCCTTGGCGCTAGTGGTT CACTTTACAAACGAGCCATGTACTGGGTGGGAGAGGCTCTGTGAAAGGCGCTGGAGTGGGCGGATCAGAACAA AAGGCTACACACTACGACACTACTATGCGGACTAGTGAAGGCGGCTACGATCAGGAGCGGAGCAAACTCA CAGTCTACTCGAGATGGACTCTGTGAAGACAGAGATACAGCCACTACTATGTTATGTTGGTCTGCTGACTACTAC GGATATCTTACTATGGGACAGAGGAGTGTGGTGACAGTGAATCA AVQLVESGGIGLVPGSGSKITCAASGFTFNAAAMVWVRAPKGLFVWYRIKANNVATYVADSWKFRISDRDSKSTV YLQMSNKIEDIATYKYIVLITTRDHFDPYWGQGVLVTVSS	369
2	Effi3 VHvar3_aa	PRT	GKATCGTCTGACTCAGTCCCGCTCTCTGCGAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCGGAAGCTCCGAG TCAGTGTGACTGTCAAGGGAATTACAGGCTGTACTGGTCTCTGAGAGAGCCGCGGCGAGTCCCTTAACAGTCTGATCTAT CGGATGTCTAACAGAGACAGTGGGGTGGCCGATAGGTTCTCAAGGAGCGGAGTCCGAAACCGACTTTTACACTGAAATTT CTCGGTGGAGGCTGAAGATGTCGGAACCTACTATGCGACAGTTTCTGGAAATACCTCACACTTTCGGGCGGAGCACT AAGCTGGAGCTGAAGCGT	123
3	Effi3 VLvar3	ADN	DIMLTQSPPSLPTVTPGEPASIRSSQSLITVKGITSILYVHFLQKPQSPKLLIRMSNRDSGVPDRFSGSSETDFTLKISRVEAE VGITYCAQFLEYPHTFGAGTKLEKR	113
4	Effi3 VLvar3_aa	PRT	GACATGCTGTGACACAGAGTCCCTCTCCCTGCCAGTGCACACTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCGGAGAGCTCCCA GGACTGTGACTGTCAAGGGAATTACCTCACTGTACTGTCTGAGGAGCCGCGGAGAGCCCTAAACTGCTGTACTCT ATCGATGTCTAACAGAGACAGTGGAGTGGCCGATAGGTTCTCAGGAGCGGCTCCGGAACCGACTTACACTGAAAT TTCTCGGTGGAGGCTGAAGATGCGGACCTACTATTGCGCACAGTTCTGAGAGTATCCCCACACACTTTGAGCAGGCGAC TAAGCTGGAGCTGAAGCGT	339
5	Effi3-VLvar4	ADN	DIMLTQSPPSLPTVTPGEPASIRSSQSLITVKGITSILYVHFLQKPQSPKLLIRMSNRDSGVPDRFSGSSETDFTLKISRVEAE VGITYCAQFLEYPHTFGAGTKLEKR	113
6	Effi3-VLvar4_aa	PRT	ATGCTGTGCTGCAAGTGGGTCTCTGGTCAAGCTCTGTTCAAGGGGTGCATGTGCTGTGCGAGCTGTGGAATCTGGGGG GGGCTGTGCTCAAGCCCGGCGGGTCTCTGAAATCACTGTGCGCGCTAGTGGGTTACCTTTACAAACGAGCCATGTACTG GGTTCGACAGGCTCTTGAAGAGGCTGTGAAGTGGGTGGGCGGATCAGAACAGGCTAACACACTGCACTTACTAT GGCGACTATGAAGGCGGAGGTTCACCATTAAGCCCGAGCATAGCAATCCACAGCTCTACTCTGCAATGGAGCTCTGTGA AGACAGAAAGATATGCTCCACTCTATTTGTTATGCTGTGCTGCTACTACAGGAGGATTTACTTTGACTATTGGGGACAG GGAGTGTGGTGACAGTGAAGTCA	423
7	Effi3 VHvar3 (+ péptido señal)	ADN	MLVLQVLTALPQGVHCAVLQVESGGGLVQPQSGSKITCAASGFTFNAAAMVWVRQAPKGLVWYRIKANNVATYV ADSWKFRITSDSDSKSTVYLQMSVKTEIDTATYCVVLLITTRDHFDPYWGQGVLVTVSS	141
8	Effi3 VHvar3_aa (+ péptido señal)	PRT	ATGAAGTTTCTGCTCAGTTCTGGGCGCTGATGTGCTGTGTATCTCTGGCGCTACCGGAGACATGCTCTGACTCAGTCCC CTCTCTCCGCGAGTGACCTGGAGAGCGACATCTATCAGTTGCGGAGCTCCAGTCCGACTCAGTCTGACTGTCAAGGGA ATTACAGCGCTGTACTGTCTCTGAGAGCGCGGCGGCTCCCTCAAGTGTGATCTATCGGATGCTTACAGAGAGACAG TGGGTTGCGCATAGTTCTCTAGGCGAGCGGCTCGGAAACCGACTTACACTGAAATTTCTCGCGTGGAGCTGAAGATG TCGGAACTACTACTTCGGACAGTTCTGAGATACCTCACACTTTCGGGGGAGGCACTAAGCTGAGCTGAAGCGT	399
9	Effi3 VLvar3 (+ péptido señal)	ADN	MKFPAPQIGLVILCPGATGDIVLTQSPPSLPTVTPGEPASIRSSQSLITVKGITSILYVHFLQKPQSPKLLIRMSNRDSGVPDR FSGSGSDFTLKISRVEAEVGYCAQFLEYPHTFGAGTKLEKR	133
10	Effi3 VLvar3_aa (+ péptido señal)	PRT	ATGAAGTTTCTGCTCAGTTCTGGGCGCTGATGTGCTGTGATCTCTGGGCGACAGCGGAGACATGCTGTGACACAGAT CCCTCTCTCTGCGAGCTGAGAGCTGAGACATCTATCAGTTGCGGAGCTCCGAGGAGCTGCTGACTGTCAAGGG CATTACTCACTGTACTGTCTCTGAGAGCGCGGCGAGGCTCAACTGCTGATCTATCGGATGCTTACAGAGACA GTGAGTGGCCGATAGTTCTCTAGGCGAGGCGGTGGGAACGACTTACACTGAAATTTCTCGGTGGAGGCTGGAAGT GTGCGCACTACTATTCGGACAGTCTTCTGGAGTATCCCGACTTTTGGAGCGGCACTAAGCTGAGCTGGAAGCT	399
11	Effi3-VLvar4 (+ péptido señal)	ADN	MKFPAPQIGLVILCPGATGDIVLTQSPPSLPTVTPGEPASIRSSQSLITVKGITSILYVHFLQKPQSPKLLIRMSNRDSGVPDR FSGSGSDFTLKISRVEAEVGYCAQFLEYPHTFGAGTKLEKR	133
12	Effi3-VLvar4_aa (+ péptido señal)	PRT	ATGAAGTTTCTGCTCAGTTCTGGGCGCTGATGTGCTGTGATCTCTGGGCGACAGCGGAGACATGCTGTGACACAGAT CCCTCTCTCTGCGAGCTGAGAGCTGAGACATCTATCAGTTGCGGAGCTCCGAGGAGCTGCTGACTGTCAAGGG CATTACTCACTGTACTGTCTCTGAGAGCGCGGCGAGGCTCAACTGCTGATCTATCGGATGCTTACAGAGACA GTGAGTGGCCGATAGTTCTCTAGGCGAGGCGGTGGGAACGACTTACACTGAAATTTCTCGGTGGAGGCTGGAAGT GTGCGCACTACTATTCGGACAGTCTTCTGGAGTATCCCGACTTTTGGAGCGGCACTAAGCTGAGCTGGAAGCT	399
13	Effi3-VLvar4_aa (+ péptido señal)	PRT	MKFPAPQIGLVILCPGATGDIVLTQSPPSLPTVTPGEPASIRSSQSLITVKGITSILYVHFLQKPQSPKLLIRMSNRDSGVPDR FSGSGSDFTLKISRVEAEVGYCAQFLEYPHTFGAGTKLEKR	133
14	Effi3 VHvar3 CDR1	ADN	TTCACTTTACAAACGCGAGCCATGTAC	27
15	Effi3 VHvar3 CDR1-aa	PRT	FTFNAAAM	9
16	Effi3 VHvar3 CDR2	ADN	CGGATCAGAACAAAGGCTAACAACTACGCAACTTACTATGCCGACTCAGTGAAGGGC	57
17	Effi3 VHvar3 CDR2-aa	PRT	RIKTKANNVATYVADSVK	19
18	Effi3 VHvar3 CDR3	ADN	GTGCTGTGACTACTACAGGGGATTACTTGACTAT	36
19	Effi3 VHvar3 CDR3-aa	PRT	VLLITTRDHFY	12
20	Effi3 VLvar3 CDR1	ADN	CGAAGCTCCGCACTGCTGCTCAAGGGAATTTACCAGCCTGTAC	48
21	Effi3 VLvar3-CDR1_aa	PRT	RSQSILITVKGITSILY	16
22	Effi3 VLvar3/4 CDR2	ADN	CGGATGTCTAACAGAGACAGT	21

[illegible]

(continuación)

Nb	Nombre	Tipo	Secuencia	Long
32	IgG2b_aa	PRT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTESKAAIGCLVIDYFPPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKVERKCCVECPQCPAPGAPSVFLFPKPKDITLMISRITPEVTCVVDVDSDEPEVQNWVYDGVVHN AKTKPREEQNSTFRVSVLTVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGYPISDIAVEWESNGQPENNYKTTTPHMILDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSYNMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	326
33	CLkappa	ADN	ACGGTGGCTGCACCACTCTCTTCATCTCCCGCATCTGATGAGCAGTTCGAATCTGGAACCTGCTCTGTCTGCTGCTGC TGAATACCTCTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGAGTGGAAAGGCCCTTCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAG TGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACACCTCCTCAGCAGCCTCCTGAGCTGAGCAAGCAGAGCTACGAGAA ACACAAGTCTACGGCTGCGAAGTACACCATCATCGGGCTGAGCTCGCCGCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT TAG	321
34	CLkappa_aa	PRT	TVAAVPSVPHPPSDQLKSLASVCLLNNFYPRAKVQVQVQNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSVPSVKSNRGECC	106
35	CLlambda	ADN	GGTCAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTCCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCCAAGGCCACACTGCT GTGTCTCATAGTGAAGTCTTACCCGGGAGCGGTGACAGCTGGCTGGAAGGAGAGATAGCAGCCCCCTCAAGCGGGAGTG GAGACCAACACACCTCCCAACAAGCAACAAAGTACGGCGCAAGCTACTTCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCAGTGG AAGTCCACAGAAGCTACAGCTGACGATGACGATGAGGGAGCACCGCTGGAGAAGACAGTGGCCCTTACAGAAATGT TCATAG	321
36	CLlambda_aa	PRT	GGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAMKADSSPKKAGVETTPPKCKSNINIKYAASVLSLTPEQWKSRR SYSCQVTHEGSTEIVKVAPECS	106
37	HumanFc_ IgG1(UniprotP01857)	PRT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLVIDYFPPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSNLSLTQTYTCNV NINIKPSNTKVDKVERKCCVECPQCPAPGAPSVFLFPKPKDITLMISRITPEVTCVVDVDSDEPEVQNWVYDGVVHN HNATKPREEQNSTFRVSVLTVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV LVKGYPISDIAVEWESNGQPENNYKTTTPHMILDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSYNMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	330
38	HumanFc_ IgG4(UniprotP01861)	PRT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTESKAAIGCLVIDYFPPEVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSNLSLTQTYTCNV DHKPSNTKVDKVERKCCVECPQCPAPGAPSVFLFPKPKDITLMISRITPEVTCVVDVDSDEPEVQNWVYDGVVHN AKTKPREEQNSTFRVSVLTVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGYPISDIAVEWESNGQPENNYKTTTPHMILDSGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSYNMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	327
39	CD127 humana aa	PRT	PTILSTTHGMVSLQVYSGESGACNGQEDDELDDVSESCYQLEVNGSQHSILTCARFEDPDVNTNLEFECGALVEVKCLN FRKLQETPIETKFKELIGRHCYKVGKSLTCKKXNITTKVPEAPEDLSVTPRGANDEVTYENTSHLCKRYVNVIMHDAVHRQ EKDENIWHYVHLSSTLLTLQRKLPAAAYVEIKVHSIDPHYFAGHWSFSPSYRTPHINSSGEMEDPILLISLHFSFVALLV LACVLVKKRIRPVWPSLPDPIKLTLEHCKKFFIRNLNYSFNPSEFLDQDIHVEDDQARDEVEGFLQDTFPQGLEEKORLGG DVQSPNCTSEDVAWITPESFGRESSLTCLAGNVASACDAPHSSRSILDCESGANGCHVYQDALLSLGTTINSTLPPHFSLQSGHIL NPVAKGQRLTSLSRQFEAYVTMSFYSQKQ	459
40	humana CD127_21-239 aa	PRT	ESGYAQNGQLEDAELDDVSCYQLEVNGSQHSILTCARFEDPDVNTNLEFECGALVEV KCLNFRKLQETPIETKFKELIGKSNICVGVGKSLTCKKIDITTKVPEAPEDLSVNR EGANDVVTITNLSHLOKRYKVMHDAVAYROKIDENKWTHTVHLSSTLLTLQRKLPAAAM YEKVISIPDIHYKGFWSFWSFSPSYRTPHINSSGEMD	219

[illegible]

[illegible]

Nb	Nombre	Tipo	Secuencia	(continuación)	Long
51	Eff3_VL4_Cilambda	ADN	ATGAAGTTCCTTGCTGCTGAGTTCTGTGCATCTCTGGGGCAACGGCGACATCGTGTGACACAGAGT CCCTCTCCCTGCGAGTGAACACTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCGGAGCTCCGAGGAGCTGTGACTGTCAAGGG CAATTACTACTGCTACTGTTCTCTGCGAGAGCCGGGGCAGAGCCCTAACTGCTGATCTATGGAATGCTTAACAGAGACA GTGGAGTGGCCGATGTTCTCAGCGCGGGTCGGAGACCGACTTACACTGAAAAATTTCTCGCTGGAGGCTGAAGT GTGGGCACTACTATTGGCGACAGTTTCTGGAGTATCCCACTTTGGAGCAGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGTGG TCAGCCCAAGGGTGGCCCTCGCTCTGTCGGGCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAACAGGGCCACACTGGTGTG TCTCATATGCTGACTTCTACCGGGAGCGGTGACAGTGCCTGAGGCCAGATAGAGCCCGCTCAAGCGCGGAGTGGAG ACCACACACCTCCAAACAAAGCAACAAGTACCGCGGCCAGCACTATCTGAGCTGAGCGCTGACGAGGAGTGGAAAT CCCACAGAAGCTACAGCTCCAGGCTACGCTATGAAGGGGAGCAGCGCTGGAGAGACAGTSGCCCTACAGAATGTTCAAT AG	720	
52	Eff3_VL4_Cilambda_aa	PRT	MKFPAQFLGLVLCIPGATGDVLTQSPSSIVPTGPEPASISCRSSQSLITVKGITSLYWFLQKPKGSKPLLIWRMSNRDSVPPDR FSGSGSDTFTLISRVEADVGTYTCAQLELYPHFTFGATKLELRGPKRAAPSLTPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETLTPSKSNHNKYAAASSVLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS		239
53	Eff3_VL3_Cilambda	ADN	ATGAAGTTTCTGCTGCTGCTGGGCTGATGCTGTGTGATCTCTGGCGCTACCGGAGACATGCTGCTCTGACTGACTCCC CCTCTTCCCTGGCAGTGAACACTGGAGCGCAGGACTATGACTTGGCGAAGCTCCCGACTGCTGACTGACTGTCAAGGGA ATTACAGCCTGACTGCTGCTGCGAAGCCGGCCAGTCCCTTAACTGCTGATCTCGGATGCTCTAACAGACAG TG6GGTGCCGATAGGTTCCTCAGGACAGCGGGTCCGAAACCGACATTACACGAAAAATTTCCGCTGGAGGCTGAAGATG TCGGAGCTACTATTTCGCGACAGTTTCTGGAATACCTTCACATCTTCGCGGCGAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGTGGT CAGCCCAAGGCTGCCCTCTGGTCTACTCTGTCGGCTCTCTCTGAGGAGCTCTCAAGCCAAACAGGCCACACTGGTGTGT CTCATATGCTGACTTCTACCGGGAGCGCTGACAGTGGCTGGAAAGCAGATAGCAGCCCGCTCAAGCGCGGAGTGGAG ACCACACACCTCCAAACAAAGCAACAAGTACCGCGGCCAGCACTATCTGAGCTGACGCTGACGCTGAGCAGTGGAGT CCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCGATGAAGGAGGACCGCTGGAGAGACAGTSGGCCCTACAGAATGTTCAAT AG	720	
54	Eff3_VL3_Cilambda_aa	PRT	MKFPAQFLGLVLCIPGATGDVLTQSPSSIVPTGPEPASISCRSSQSLITVKGITSLYWFLQKPKGSKPLLIWRMSNRDSVPPDR FSGSGSDTFTLISRVEADVGTYTCAQLELYPHFTFGATKLELRGPKRAAPSLTPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETLTPSKSNHNKYAAASSVLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS		239
55	Péptido de CD127	PRT	ESGVAQNGLDEDALEDDYSESCYSQLE		27
56	VH de MD707-3	PRT	AHVHVESGGGLVQPKSLKPSCAASGFTFSNAAMWYVRQAPKGLIEWARIRTKANNHYATVAESVKGRFTTIRSDSKSMVY		123
57	VL de MD707-3	PRT	LQMDNVKTDITAMHYCVIAVLLTTRDFDYWGCGVMTVSS DNLDTQAPLSVSTPVSASISCRSSQSLITVKGITSLYWFLQKPKGSKPLLIWRMSNLASGVPPDRFRGSGSETDFTLISKSVETED VGYYCYAQLELYPHITGAGTLEKRS		113

Referencias

- Adams, A.B., Pearson, T.C., and Larsen, C.P. (2003). Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol. Rev.* 196, 147-160.
- Albuquerque, A.S., Cortesão, C.S., Foxall, R.B., Soares, R.S., Victorino, R.M.M., and Sousa, A.E. (2007). Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 3252-3259.
- Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 273, 927-948.
- Almagro, J.C., Teplyakov, A., Luo, J., Sweet, R.W., Kodangattil, S., Hernandez-Guzman, F., and Gilliland, G.L. (2014). Second antibody modeling assessment (AMA-II). *Proteins* 82, 1553-1562.
- Armour, K.L., Clark, M.R., Hadley, A.G., and Williamson, L.M. (1999). Recombinant human IgG molecules lacking Fc γ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur. J. Immunol.* 29, 2613-2624.
- Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.-L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., and Stinissen, P. (2010). Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor α gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun.* 11, 326-333.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113, 3716-3725.
- Chan, A.C., and Carter, P.J. (2010). Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 301-316.
- Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.
- Datta-Mannan, A., Witcher, D.R., Tang, Y., Watkins, J., Jiang, W., and Wroblewski, V.J. (2007). Humanized IgG1 variants with differential binding properties to the neonatal Fc receptor: relationship to pharmacokinetics in mice and primates. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35, 86-94.
- Desmet, J., Spriet, J., and Lasters, I. (2002). Fast and accurate side-chain topology and energy refinement (FASTER) as a new method for protein structure optimization. *Proteins* 48, 31-43.
- Ewert, S., Honegger, A., and Plückthun, A. (2003). Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 1517-1528.
- Haudebourg, T., Poirier, N., and Vanhove, B. (2009). Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 22, 509-518.
- Hinton, P.R., Johlfs, M.G., Xiong, J.M., Hanestad, K., Ong, K.C., Bullock, C., Keller, S., Tang, M.T., Tso, J.Y., Vasquez, M., et al. (2004). Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J. Biol. Chem.* 279, 6213-6216.
- Honegger, A., Malebranche, A.D., Röthlisberger, D., and Plückthun, A. (2009). The influence of the framework core residues on the biophysical properties of immunoglobulin heavy chain variable domains. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 22, 121-134.
- Idusogie, E.E., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P.Y., Ultsch, M., Meng, Y.G., and Mulkerrin, M.G. (2000). Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 4178-4184.
- Jariwala, S.P., Abrams, E., Benson, A., Fodeman, J., and Zheng, T. (2011). The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 41, 1515-1520.
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.
- Labrijn, A.F., Buijsse, A.O., van den Bremer, E.T.J., Verwilligen, A.Y.W., Bleeker, W.K., Thorpe, S.J., Killestein, J., Polman, C.H., Aalberse, R.C., Schuurman, J., et al. (2009). Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 27, 767-771.

Lazar, G.A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J.S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H.S., Eivazi, A., Yoder,

S.C., et al. (2006). Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* **103**, 4005-4010.

Martin, A.C.R. (2001). Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In *Antibody Engineering*, D.R. Kontermann, and D.S. Dübél, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 422-439.

Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullillou, J.-P., and 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.

North, B., Lehmann, A., and Dunbrack, R.L. (2011). A new clustering of antibody CDR loop conformations. *J. Mol. Biol.* **406**, 228-256.

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

Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J.R. (2008). Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2517-2527.

Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., and 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.

Ryan, M.C., Hering, M., Peckham, D., McDonagh, C.F., Brown, L., Kim, K.M., Meyer, D.L., Zabinski, R.F., Grewal, I.S., and Carter, P.J. (2007). Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 3009-3018.

Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., et al. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγRI. *J. Biol. Chem.* **276**, 6591-6604.

Shinohara, T., Nemoto, Y., Kanai, T., Kameyama, K., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Totsuka, T., Ikuta, K., and Watanabe, M. (2011). Upregulated IL-7 receptor α expression on colitogenic memory CD4⁺ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 2623-2632.

Steurer, W., Nickerson, P.W., Steele, A.W., Steiger, J., Zheng, X.X., and Strom, T.B. (1995). Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **155**, 1165-1174.

Strohl, W.R. (2009). Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 685-691.

Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., and Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* **206**, 655-667.

Vargas-Madrado, E., and Paz-García, E. (2003). An improved model of association for VH-VL immunoglobulin domains: asymmetries between VH and VL in the packing of some interface residues. *J. Mol. Recognit. JMR* **16**, 113-120.

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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> OSE IMMUNOTHERAPEUTICS

<120> Anticuerpos no antagonistas dirigidos contra la cadena alfa del dominio extracelular del receptor de IL7 y uso del mismo en el tratamiento del cáncer.

<130> B11725A/AD/FS

<150> 62/301271

<151> 29-02-2016

<160> 109

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 369

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Effi3 VHvar3

<400> 1

```

gctgtgcagc tggtcgaatc tggggggggg ctggtccagc ccggcggggtc tctgaaaatc      60
acttgcgccg ctagtggggtt cacctttaca aacgcagcca tgtactgggt cgcacaggct      120
cctggaaagg gcctggagtg ggtggcacgg atcagaacaa aggctaacaa ctacgcaact      180
tactatgccg actcagtga gggcagggtt accattagcc gcgacgatag caaatccaca      240
gtctacctgc agatggactc tgtgaagaca gaagatactg ccacctacta ttgtattgtg      300
gtcgtgctga ctactacacg ggattacttt gactattggg gacagggagt gctggtgaca      360
gtgagttca                                     369
    
```

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Effi3 VHvar3_aa

<400> 2

```

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Lys Ile Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Ala
          20           25           30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
    
```

ES 2 737 307 T3

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Thr
65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3 VLvar3

<400> 3

gacatcgtcc tgactcagtc cccctcttcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct 60
atcagttgcc gaagctccca gtcactgctg actgtcaagg gaattaccag cctgtactgg 120
ttcctgcaga agcccgcca gtcccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac 180
agtgggggtgc ccgatagggt ctcaggcagc ggggtccgaaa ccgactttac actgaaaatt 240
tctcgcgtgg aggctgaaga tgtcggaacc tactattgcg cacagtttct ggaataccct 300
cacactttcg gggcaggcac taagctggag ctgaagcgt 339

<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3 VLvar3_aa

<400> 4

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Val
20 25 30

Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

ES 2 737 307 T3

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

<210> 5
<211> 339
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3-VLvar4

<400> 5

gacatcgtgc tgacacagag tccctcctcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct 60
atcagttgcc gaagctccca ggacctgctg actgtcaagg gcattacctc actgtactgg 120
ttcctgcaga agcccgggca gagccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac 180
agtggagtgc ccgatagggt ctcaggcagc gggtcoggaa ccgactttac actgaaaatt 240
tctcgctggg aggctgaaga tgcgcgcacc tactattgcg cacagtttct ggagtatccc 300
cacacctttg gagcaggcac taagctggag ctgaagcgt 339

<210> 6
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3-VLvar4_aa

<400> 6

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asp Leu Leu Thr Val
20 25 30

Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

ES 2 737 307 T3

Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Arg	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75				80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Phe
				85					90					95	
Leu	Glu	Tyr	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
			100					105					110		
Arg															

<210> 7
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Effi3 VHvar3 (+ péptido señal)

<400> 7

atgctggtcc	tgcagtgggt	cctggtcacc	gctctgtttc	agggggtcca	ttgtgctgtg	60
cagctgggtcg	aatctggggg	ggggctgggc	cagcccggcg	ggtctctgaa	aatcacttgc	120
gccgctagt	ggttcacctt	tacaaacgca	gccatgtact	gggtccgaca	ggctcctgga	180
aagggcctgg	agtgggtggc	acggatcaga	acaaaggcta	acaactacgc	aacttactat	240
gccgactcag	tgaagggcag	gttcaccatt	agccgcgacg	atagcaaata	cacagtctac	300
ctgcagatgg	actctgtgaa	gacagaagat	actgccacct	actattgtat	tgtggctgtg	360
ctgactacta	cacgggatta	ctttgactat	tggggacagg	gagtgctggt	gacagtgagt	420
tca						423

la 8

<210> 8
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Effi3 VHvar3_aa (+ péptido señal)

<400> 8

Met	Leu	Val	Leu	Gln	Trp	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Leu	Phe	Gln	Gly	Val
1				5					10					15	
His	Cys	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro

ES 2 737 307 T3

20	25	30
Gly Gly Ser Leu Lys Ile Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr	35	40
Asn Ala Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu	50	55
Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr	65	70
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys	85	90
Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala	100	105
Thr Tyr Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe	115	120
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser	130	135
		140

5	<210> 9 <211> 399 <212> ADN <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Effi3 VLvar3 (+ péptido señal) <400> 9
	atgaagtttc ctgctcagtt tctgggcctg attgtgctgt gtattcctgg cgctaccgga 60
	gacatcgccc tgactcagtc cccctcttcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct 120
	atcagttgcc gaagctccca gtcaactgctg actgtcaagg gaattaccag cctgtactgg 180
	ttcctgcaga agcccggcca gtcccctaaa ctgctgatct atcgatgtc taacagagac 240
	agtgggggtgc ccgatagggt ctcaggcagc gggccgaaa ccgactttac actgaaaatt 300
	tctcgcgtgg aggctgaaga tgcggaacc tactattgctg cacagtttct ggaataccct 360
	cacactttcg gggcaggcac taagctggag ctgaagcgt 399
15	<210> 10 <211> 133 <212> PRT <213> Secuencia artificial
20	<220> <223> Effi3 VLvar3_aa (+ péptido señal)
25	<400> 10

ES 2 737 307 T3

```

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
1          5          10          15

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
          20          25          30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
          35          40          45

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
50          55          60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
65          70          75          80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe
          85          90          95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
          100          105          110

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
          115          120          125

Leu Glu Leu Lys Arg
          130

```

<210> 11
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Effi3-VLvar4 (+ péptido señal)

<400> 11

```

atgaagttcc ctgctcagtt cctggggctg attgtcctgt gcattcctgg ggcaaccggc      60
gacatcgtgc tgacacagag tccctcctcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct      120
atcagttgcc gaagctccca ggacctgctg actgtcaagg gcattacctc actgtactgg      180
ttcctgcaga agcccgggca gagccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac      240
agtggagtgc ccgatagggt ctcaggcagc gggtcoggaa ccgactttac actgaaaatt      300
tctcgcgtgg aggctgaaga tgtcggcacc tactattgcg cacagtttct ggagtatccc      360
cacacctttg gagcaggcac taagctggag ctgaagcgt      399

```

<210> 12
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Effi3-VLvar4_aa (+ péptido señal)

<400> 12

ES 2 737 307 T3

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asp
 35 40 45

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg
 130

5 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Effi3 VHvar3_CDR1
 <400> 13
 ttcaccttta caaacgcagc catgtac 27

15 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Effi3 VHvar3_CDR1-aa
 <400> 14

25 Phe Thr Phe Thr Asn Ala Ala Met Tyr
 1 5

30 <210> 15
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3 VHvar3_CDR2

5 <400> 15
cggatcagaa caaaggctaa caactacgca acttactatg cggactcagt gaagggc 57

10 <210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Effi3 VHvar3_CDR2-aa
<400> 16

Arg	Ile	Arg	Thr	Lys	Ala	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
1				5					10					15	

Val Lys Gly

20 <210> 17
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Effi3 VHvar3_CDR3

30 <400> 17
gtcgtgctga ctactacacg ggattacttt gactat 36

35 <210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Effi3 VHvar3_CDR3-aa
<400> 18

Val	Val	Leu	Thr	Thr	Thr	Arg	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10		

45 <210> 19
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Effi3 VLvar3_CDR1

55 <400> 19
cgaagctccc agtcactgct gactgtcaag ggaattacca gcctgtac 48

<210> 20
<211> 16
<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Effi3 VLvar3-CDR1_aa
 <400> 20

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr
 1 5 10 15

10 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Effi3 VLvar3/4_CDR2

20 <400> 21
 cggatgtcta acagagacag t 21

<210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Effi3 VLvar3/4_CDR2aa

30 <400> 22

Arg Met Ser Asn Arg Asp Ser
 1 5

35 <210> 23
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Effi3 VLvar3/4_CDR3

<400> 23
 gcacagtttc tggaataccc tcacact 27

45 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Effi3 VLvar3/4_CDR3aa

<400> 24

Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr
 1 5

55 <210> 25
 <211> 48
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Effi3-VLvar4_CDR1

5

<400> 25
cgaagctccc aggacctgct gactgtcaag ggcattacct cactgtac 48

10

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Effi3-VLvar4_CDR1_aa

<400> 26

Arg	Ser	Ser	Gln	Asp	Leu	Leu	Thr	Val	Lys	Gly	Ile	Thr	Ser	Leu	Tyr
1				5					10					15	

20

<210> 27
<211> 993
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> IgG1m (E333A)

<400> 27

30

gctagcacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcaccct	cctccaagag	cacctctggg	60
ggcacagcgg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacggtgtcg	120
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcggtg	cacaccttcc	cggtgttcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtgggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	caccagacc	240
tacatctgca	acgtgaatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggaacaaga	agttgagccc	300
aatcttctgtg	acaaaactca	cacatgccca	ccgtgccag	cacctgaact	cctgggggga	360

ES 2 737 307 T3

```

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgcgaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
atgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 993

```

<210> 28
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgG1m (E333A)_aa
 <400> 28

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	

ES 2 737 307 T3

Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
130						135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		195					200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
210						215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265					270		
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290						295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
				325					330						

<210> 29
 <211> 984
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IgG4m (S228P)

<400> 29

```

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc      300
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gacactgagt tcctgggggg accatcagtc      360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg      420
tgcggtggtg tggacgtgag ccaggaagac ccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat      480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac      540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat ccagaggaga gatgaccaag      720
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag      780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc      840
gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg      900
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc      960
ctctccctgt ctccgggtaa atga                                           984

```

<210> 30
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> IgG4m (S228P)_aa

 <400> 30

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr
65					70					75				80	

ES 2 737 307 T3

Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	115	120	125
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	130	135	140
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	145	150	155
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	165	170	175
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	180	185	190
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	195	200	205
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	210	215	220
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	225	230	235
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	245	250	255
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	260	265	270
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	275	280	285
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	290	295	300
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	305	310	315
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												

ES 2 737 307 T3

5 <210> 31
<211> 981
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IgG2b

10 <400> 31

```
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcggtg cacaccttcc cagctgtcct acagtctctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatgttgtg tgcagtgccc accgtgccc aacaccaagg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggagggtgc ataatgcca gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcacgtg tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcca aaccaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      900
gtcttctcat gtcctgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tcctgtctc cgggtaaatg a                                          981
```

15 <210> 32
<211> 326
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IgG2b_aa

20 <400> 32

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1          5          10          15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
```

25

ES 2 737 307 T3

Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	115	120	125	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	130	135	140	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	145	150	155	160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	165	170	175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	180	185	190	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	195	200	205	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	210	215	220	
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	225	230	235	240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	245	250	255	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	260	265	270	
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys				

275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315
		320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	

<210> 33
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CLkappa

<400> 33

acggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga	60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg	120
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc	180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa	240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc	300
ttcaacaggg gagagtgtta g	321

<210> 34
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CLkappa_aa

<400> 34

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln	
1	15
	5
	10
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr	
	30
	20
	25
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser	
	45
	35
	40
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr	
	60
	50
	55

ES 2 737 307 T3

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

5 <210> 35
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> CLlambda

<400> 35

```
ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa      60
gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg      120
gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtg agaccaccac accctccaaa      180
caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag      240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg      300
gcccctacag aatgttcata g                                     321
```

15 <210> 36
<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> CLlambda_aa

<400> 36

```
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1      5      10      15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
      20      25      30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
      35      40      45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50      55      60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65      70      75      80
```

ES 2 737 307 T3

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 37

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HumanFc_IgG1(UniprotP01857)

<400> 37

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

ES 2 737 307 T3

```

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      180                      185                      190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      195                      200                      205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      210                      215                      220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
      225                      230                      235                      240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      245                      250                      255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      260                      265                      270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275                      280                      285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290                      295                      300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305                      310                      315                      320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325                      330

```

<210> 38
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> HumanFc_IgG4(UniprotP01861)

 <400> 38

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
  1      5      10      15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      20      25      30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      35      40      45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

```

ES 2 737 307 T3

50						55						60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr		
65					70					75					80		
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
			85						90					95			
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro		
			100					105						110			
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys		
		115					120					125					
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val		
	130					135					140						
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp		
145					150					155					160		
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe		
				165					170					175			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
			180					185					190				
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu		
		195					200					205					
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg		
	210					215					220						
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys		
225					230					235					240		
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp		
				245					250					255			
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys		
		260						265					270				
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser		
		275					280					285					
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser		
	290					295					300						

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 39
<211> 459
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CD127 humano aa

<400> 39

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln
1 5 10 15

Val Val Ser Gly Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp
20 25 30

Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val
35 40 45

Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val
50 55 60

Asn Thr Thr Asn Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val
65 70 75 80

Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr
85 90 95

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly
100 105 110

Glu Lys Ser Leu Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys
115 120 125

Pro Glu Ala Pro Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn
130 135 140

Asp Phe Val Val Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val
145 150 155 160

Lys Val Leu Met His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn
165 170 175

Lys Trp Thr His Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln

ES 2 737 307 T3

180														
185														
190														
Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ile
	195						200					205		
Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Tyr
	210					215					220			
Tyr	Phe	Arg	Thr	Pro	Glu	Ile	Asn	Asn	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	Asp
225					230					235				240
Ile	Leu	Leu	Thr	Ile	Ser	Ile	Leu	Ser	Phe	Phe	Ser	Val	Ala	Leu
				245					250					255
Val	Ile	Leu	Ala	Cys	Val	Leu	Trp	Lys	Lys	Arg	Ile	Lys	Pro	Ile
			260					265					270	Val
Trp	Pro	Ser	Leu	Pro	Asp	His	Lys	Lys	Thr	Leu	Glu	His	Leu	Cys
		275					280					285		Lys
Lys	Pro	Arg	Lys	Asn	Leu	Asn	Val	Ser	Phe	Asn	Pro	Glu	Ser	Phe
	290					295					300			Leu
Asp	Cys	Gln	Ile	His	Arg	Val	Asp	Asp	Ile	Gln	Ala	Arg	Asp	Glu
305					310					315				320
Glu	Gly	Phe	Leu	Gln	Asp	Thr	Phe	Pro	Gln	Gln	Leu	Glu	Glu	Ser
				325					330					335
Lys	Gln	Arg	Leu	Gly	Gly	Asp	Val	Gln	Ser	Pro	Asn	Cys	Pro	Ser
			340					345					350	Glu
Asp	Val	Val	Ile	Thr	Pro	Glu	Ser	Phe	Gly	Arg	Asp	Ser	Ser	Leu
		355					360					365		Thr
Cys	Leu	Ala	Gly	Asn	Val	Ser	Ala	Cys	Asp	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser
	370					375					380			Ser
Ser	Arg	Ser	Leu	Asp	Cys	Arg	Glu	Ser	Gly	Lys	Asn	Gly	Pro	His
385					390					395				400
Tyr	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Gly	Thr	Thr	Asn	Ser	Thr	Leu
				405					410					415
Pro	Pro	Phe	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Ile	Leu	Thr	Leu	Asn	Pro	Val
			420					425					430	Ala
Gln	Gly	Gln	Pro	Ile	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Asn	Gln	Glu	Glu
			435					440				445		Ala
Tyr	Val	Thr	Met	Ser	Ser	Phe	Tyr	Gln	Asn	Gln				
	450						455							

<210> 40
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> humano CD127_21-239 aa

<400> 40

```

Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp
1          5          10          15

Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln
          20          25          30

His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val Asn Thr Thr Asn
          35          40          45

Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn
50          55          60

Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu
65          70          75          80

Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys Ser Leu
          85          90          95

Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys Pro Glu Ala Pro
          100          105          110

Phe Asp Leu Ser Val Ile Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val
          115          120          125

Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val Lys Val Leu Met
          130          135          140

His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr His
          145          150          155          160

Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln Arg Lys Leu Gln
          165          170          175

Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr
    
```

ES 2 737 307 T3

[illegible]

<210> 41
<211> 1416
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3_VH3_IgG1m(E333A)

<400> 41

atgctgggtcc	tgcagtggggt	cctgggtcacc	gctctgttttc	aggggggtcca	ttgtgctgtg	60
cagctgggtcg	aatctgggggg	ggggctggtc	cagcccggcg	ggtctctgaa	aatcacttgc	120
gccgctagtg	ggttcacctt	tacaaacgca	gccatgtact	gggtccgaca	ggctcctgga	180
aagggcctgg	agtgggtggc	acggatcaga	acaaggcta	acaactacgc	aacttactat	240
gccgactcag	tgaagggcag	gttcaccatt	agccgcgacg	atagcaaatc	cacagtctac	300
ctgcagatgg	actctgtgaa	gacagaagat	actgccacct	actattgtat	tgtggtcgtg	360
ctgactacta	cacgggatta	ctttgactat	tggggacagg	gagtgctggg	gacagtgagt	420
tcagctagca	ccaaggggccc	atcgggtcttc	cccctggcac	cctcctccaa	gagcacctct	480
gggggacacag	cgggcctggg	ctgcctggtc	aaggactact	tccccgaacc	ggtgacgggtg	540
tcgtggaact	caggcgccct	gaccagcggc	gtgcacacct	tcccggtgtg	cctacagtcc	600
tcaggactct	actccctcag	cagcgtgggtg	accgtgccct	ccagcagctt	gggcacccag	660
acctacatct	gcaacgtgaa	tcacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	gaaagttagag	720
cccaaattctt	gtgacaaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	780
ggaccgtcag	tcttcctctt	ccccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccgacc	840
cctgaggtca	catgcgtggg	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	900
tggtagctgg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaaagaca	agccgcggga	ggagcagtac	960
aacagcacgt	accgtgtggg	cagcgtcctc	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	1020
aaggagtaca	agtgcaagggt	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcgc	gaaaaccatc	1080
tccaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	atcccgggag	1140
gagatgacca	agaaccagggt	cagcctgacc	tgcttggtca	aaggcttcta	tcccagcgac	1200
atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cacgcctccc	1260
gtgctggact	ccgacggctc	cttcttcctc	tacagcaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	1320

tggcagcagg ggaacgtctt ctcattgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1416

<210> 42

<211> 471

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Effi3_VH3_IgG1m(E333A)_aa

<400> 42

Met Leu Val Leu Gln Trp Val Leu Val Thr Ala Leu Phe Gln Gly Val
1 5 10 15

His Cys Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Ile Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
35 40 45

Asn Ala Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
85 90 95

Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe
115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

ES 2 737 307 T3

Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	
		195					200					205				
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	
210						215					220					
Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	
225					230					235					240	
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				245					250					255		
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
			260					265					270			
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
		275					280					285				
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
	290					295					300					
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	
305					310					315					320	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
				325					330					335		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	
			340					345					350			
Pro	Ala	Pro	Ile	Ala	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
		355					360					365				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
	370					375					380					
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
385					390					395					400	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
				405					410					415		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
			420					425					430			
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
		435					440					445				

ES 2 737 307 T3

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 43
<211> 1407
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3_VH3_IgG4(S228P)

<400> 43

atgctggtcc	tgcagtgggt	cctggtcacc	gctctgtttc	aggggggtcca	ttgtgctgtg	60
cagctggtcg	aatctggggg	ggggctggtc	cagcccggcg	ggtctctgaa	aatcacttgc	120
gccgctagt	ggttcacctt	tacaaacgca	gccatgtact	gggtccgaca	ggctcctgga	180
aagggcctgg	agtgggtggc	acggatcaga	acaaaggcta	acaactacgc	aacttactat	240
gccgactcag	tgaagggcag	gttcaccatt	agccgcgacg	atagcaaata	cacagtctac	300
ctgcagatgg	actctgtgaa	gacagaagat	actgccacct	actattgtat	tgtggctcgtg	360
ctgactacta	cacgggatta	ctttgactat	tggggacagg	gagtgcctgg	gacagtgcgt	420
tcagctagca	ccaagggccc	atcgggtctt	cccctggcgc	cctgctccag	gagcacctcc	480
gagagcacag	ccgccctggg	ctgcctggtc	aaggactact	tccccgaacc	ggtgacgggtg	540
tcgtggaact	caggcgccct	gaccagcggc	gtgcacacct	tcccggtgtg	cctacagtcc	600
tcaggactct	actccctcag	cagcgtgggt	accgtgccct	ccagcagctt	gggcacgaag	660
acctacacct	gcaacgtaga	tcacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	gagagttgag	720
tccaaatatg	gtcccccatg	cccaccatgc	ccagcacctg	agttcctggg	gggaccatca	780
gtcttcctgt	tcccccaaaa	acccaaggac	actctcatga	tctcccggac	ccctgaggtc	840
acgtgcgtgg	tggtggacgt	gagccaggaa	gaccccgagg	tccagttcaa	ctggtacgtg	900
gatggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	aagccgcggg	aggagcagtt	caacagcacg	960
taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	caccaggact	ggctgaacgg	caaggagtac	1020
aagtgcaagg	tctccaacaa	aggcctcccg	tcctccatcg	agaaaaccat	ctccaaagcc	1080
aaagggcagc	cccagagagc	acaggtgtac	accctgcccc	catcccagga	ggagatgacc	1140
aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	aaaggcttct	acccagcga	catcgccgtg	1200
gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaa	aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	1260
tccgacggct	ccttcttcct	ctacagcagg	ctaaccgtgg	acaagagcag	gtggcaggag	1320
gggaatgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	gaggctctgc	acaaccacta	cacacagaag	1380
agcctctccc	tgtctccggg	taaatga				1407

<210> 44
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Effi3_VH3_IgG4(S228P)_aa

10

<400> 44

```

Met Leu Val Leu Gln Trp Val Leu Val Thr Ala Leu Phe Gln Gly Val
1          5          10          15

His Cys Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
          20          25          30

Gly Gly Ser Leu Lys Ile Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
          35          40          45

Asn Ala Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50          55          60

Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
65          70          75          80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
          85          90          95

Ser Thr Val Tyr Leu Gln Met Asp Ser Val Lys Thr Glu Asp Thr Ala
          100          105          110

Thr Tyr Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe
          115          120          125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130          135          140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145          150          155          160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
          165          170          175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
          180          185          190

```

ES 2 737 307 T3

Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	195	200	205
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	210	215	220
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	225	230	235
Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	245	250	255
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	260	265	270
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	275	280	285
Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	290	295	300
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	305	310	315
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	325	330	335
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	340	345	350
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	355	360	365
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	370	375	380
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	385	390	395
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	405	410	415
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	420	425	430
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	435	440	445

ES 2 737 307 T3

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 45
<211> 1404
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3_VH3_IgG2b

<400> 45

atgctgggtcc	tgcagtggtg	cctggtcacc	gctctgtttc	aggggggtcca	ttgtgctgtg	60
cagctgggtcg	aatctggggg	ggggctggtc	cagcccggcg	ggtctctgaa	aatcacttgc	120
gccgctagtg	ggttcacctt	tacaaacgca	gccatgtact	gggtccgaca	ggctcctgga	180
aagggcctgg	agtgggtggc	acggatcaga	acaaaggcta	acaactacgc	aacttactat	240
gccgactcag	tgaagggcag	gttcaccatt	agccgcgacg	atagcaaata	cacagtctac	300
ctgcagatgg	actctgtgaa	gacagaagat	actgccacct	actattgtat	tgtggtcgtg	360
ctgactacta	cacgggatta	ctttgactat	tggggacagg	gagtgtgtgt	gacagtgtgt	420
tcagctagca	ccaagggccc	atcggctctc	cccctgggcg	cctgctccag	gagcacctcc	480
gagagcacag	cgggcctggg	ctgcctggtc	aaggactact	tccccgaacc	ggtgacgggtg	540
tcgtggaact	caggcgctct	gaccagcggc	gtgcacacct	tcccagctgt	cctacagtcc	600
tcaggactct	actccctcag	cagcgtgggtg	accgtgccct	ccagcaactt	cggcacccag	660
acctacacct	gcaacgtaga	tcacaagccc	agcaacacca	aggtggacaa	gacagttgag	720
cgcaaatgtt	gtgtcgagtg	cccaccgtgc	ccagcaccac	ctgtggcagg	accgtcagtc	780
ttcctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	cccggacccc	tgagggtcacg	840
tgcgtgggtg	tggacgtgag	ccacgaagac	cccgagggtc	agttcaactg	gtacgtggac	900
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccacggggagg	agcagttcaa	cagcacgttc	960
cgtgtgggtc	gcgtcctcac	cggtgtgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	1020
tgcaaggtct	ccaacaaagg	cctcccagcc	cccatcgaga	aaaccatctc	caaaacccaaa	1080
gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccgggagga	gatgaccaag	1140
aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	1200
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccat	gctggactcc	1260
gacggctcct	tcttctctta	cagcaagctc	accgtggaca	agagcagggtg	gcagcagggg	1320
aacgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	1380

ctctccctgt ctccgggtaa atga

1404

5 <210> 46
<211> 467
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Effi3_VH3_IgG2b_aa

<400> 46

Met	Leu	Val	Leu	Gln	Trp	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Leu	Phe	Gln	Gly	Val	1	5	10	15
His	Cys	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	20	25	30	
Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	35	40	45	
Asn	Ala	Ala	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	50	55	60	
Trp	Val	Ala	Arg	Ile	Arg	Thr	Lys	Ala	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	65	70	75	80
Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	85	90	95	
Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Val	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	100	105	110	
Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ile	Val	Val	Val	Leu	Thr	Thr	Thr	Arg	Asp	Tyr	Phe	115	120	125	
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	130	135	140	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	145	150	155	160
Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	165	170	175	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	180	185	190	
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser				

ES 2 737 307 T3

195					200					205					
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys
210						215					220				
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu
225					230					235					240
Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala
				245					250					255	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			260					265					270		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		275					280					285			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
290						295					300				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe
305					310					315					320
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				325					330					335	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			340					345					350		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		355					360					365			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
370						375					380				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
385					390					395					400
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
				405					410					415	
Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
			420					425					430		
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
		435					440					445			

ES 2 737 307 T3

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

5 <210> 47
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Effi3_VL4_CLkappa
<400> 47

```
atgaagttcc ctgctcagtt cctggggctg attgtcctgt gcattcctgg ggcaaccggc 60
gacatcgtgc tgacacagag tccctcctcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct 120
atcagttgcc gaagctccca ggacctgtg actgtcaagg gcattacctc actgtactgg 180
ttcctgcaga agcccgggca gagccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac 240
agtggagtgc ccgatagggt ctcaggcagc ggggccgaa ccgactttac actgaaaatt 300
tctcgcgtgg aggtgaaga tgtcggcacc tactattgcg cacagtttct ggagtatccc 360
cacacctttg gagcaggcac taagctggag ctgaagcgta cggaggctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720
```

15 <210> 48
<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Effi3_VL4_CLkappa_aa

25 <400> 48

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
1 5 10 15

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asp
35 40 45

ES 2 737 307 T3

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 49
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Effi3_VL3_Clkappa

<400> 49

atgaagtttc ctgctcagtt tctgggcctg attgtgctgt gtattcctgg cgctaccgga	60
gacatcgtcc tgactcagtc cccctcttcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct	120
atcagttgcc gaagctccca gtcactgctg actgtcaagg gaattaccag cctgtactgg	180

ES 2 737 307 T3

```

ttcctgcaga agcccggcca gtcccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac      240
agtggggtgc ccgatagggt ctcaggcagc ggggtccgaaa ccgactttac actgaaaatt      300
tctcgcgtgg aggctgaaga tgtcgggaacc tactattgcg cacagtttct ggaataccct      360
cacactttcg gggcaggcac taagctggag ctgaagcgta cgggtggctgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa      660
gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag      720

```

<210> 50
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Effi3_VL3_CLkappa_aa

<400> 50

```

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
 1              5              10              15

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
              20              25              30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
              35              40              45

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
 50              55              60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
65              70              75              80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe
              85              90              95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
              100              105              110

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
              115              120              125

Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

```

ES 2 737 307 T3

130	135	140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu		
145	150	155
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp		
	165	170
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp		
	180	185
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys		
	195	200
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln		
	210	215
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	225	230
		235

<210> 51
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Effi3_VL4_Cllambda

<400> 51

```

atgaagttcc ctgctcagtt cctggggctg attgtcctgt gcattcctgg ggcaaccggc      60
gacatcgtgc tgacacagag tccctcctcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct      120
atcagttgcc gaagctccca ggacctgctg actgtcaagg gcattacctc actgtactgg      180
ttcctgcaga agcccgggca gagccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac      240
agtggagtgc ccgatagggt ctcaggcagc ggggccggaa ccgactttac actgaaaatt      300
tctcgctggg aggtgaaga tgtcggcacc tactattgcg cacagtttct ggagtatccc      360
cacacctttg gagcaggcac taagctggag ctgaagcgtg gtcagcccaa ggctgcccc      420
tcggtcactc tgttcccgcc ctcctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cactactggtg      480
tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cctggaaggc agatagcagc      540
cccgtaaggg cgaggagtga gaccaccaca ccctccaaac aaagcaacaa caagtacgcg      600
gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtggaaagt cccacagaag ctacagctgc      660
caggtcacgc atgaagggag caccgtggag aagacagtgg cccctacaga atgttcatag      720

```

<210> 52
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 737 307 T3

<220>

<223> Effi3_VL4_CLlambda_aa

5

<400> 52

```

Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
 1          5          10          15

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
      20          25          30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asp
      35          40          45

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
 50          55          60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
65          70          75          80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
      85          90          95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
      100          105          110

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
      115          120          125

Leu Glu Leu Lys Arg Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu
130          135          140

Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val
145          150          155          160

Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys
      165          170          175

Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser
      180          185          190

Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr
      195          200          205

Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His
210          215          220

```

ES 2 737 307 T3

Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225 230 235

<210> 53
<211> 720
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3_VL3_Cllambda

<400> 53

```
atgaagtttc ctgctcagtt tctgggcctg attgtgctgt gtattcctgg cgctaccgga      60
gacatcgtcc tgactcagtc cccctcttcc ctgccagtga cacctggaga gccagcatct      120
atcagttgcc gaagctccca gtcactgctg actgtcaagg gaattaccag cctgtactgg      180
ttcctgcaga agcccggccca gtcccctaaa ctgctgatct atcggatgtc taacagagac      240
agtgggggtgc ccgatagggt ctcaggcagc ggggtccgaaa ccgactttac actgaaaatt      300
tctcgcgtgg aggtcgaaga tgtcggaaac tactattgcg cacagtttct ggaataccct      360
cacactttcg gggcaggcac taagctggag ctgaagcgtg gtcagcccaa ggctgcccccc      420
tcggtcactc tgttcccgcc ctctctctgag gagcttcaag ccaacaaggc cacactggtg      480
tgtctcataa gtgacttcta cccgggagcc gtgacagtgg cctggaaggc agatagcagc      540
cccgtcaagg cgggagtgga gaccaccaca ccctccaaac aaagcaacaa caagtacgcg      600
gccagcagct atctgagcct gacgcctgag cagtggaagt cccacagaag ctacagctgc      660
cagggtcacgc atgaaggagg caccgtggag aagacagtgg ccctacaga atgttcatag      720
```

<210> 54
<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Effi3_VL3_Cllambda_aa

<400> 54

```
Met Lys Phe Pro Ala Gln Phe Leu Gly Leu Ile Val Leu Cys Ile Pro
1          5          10          15

Gly Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro
          20          25          30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
          35          40          45

Leu Leu Thr Val Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
50          55          60
```

ES 2 737 307 T3

```

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Arg Asp
65                               70                               75                               80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe
                               85                               90                               95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Thr Tyr Tyr
                               100                              105                              110

Cys Ala Gln Phe Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
                               115                              120                              125

Leu Glu Leu Lys Arg Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu
                               130                              135                              140

Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val
145                               150                               155                               160

Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys
                               165                              170                              175

Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser
                               180                              185                              190

Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr
                               195                              200                              205

Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His
                               210                              215                              220

Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
225                               230                               235

```

<210> 55
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido de CD127

 <400> 55

```

Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp
1                               5                               10                               15

Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu
                               20                               25

```

<210> 56
 <211> 123
 <212> PRT

ES 2 737 307 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH de MD707-3

<400> 56

```

Ala Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Glu
1           5           10           15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
          20           25           30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
          50           55           60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Met
65           70           75           80

Val Tyr Leu Gln Met Asp Asn Val Lys Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr
          85           90           95

Tyr Cys Ile Val Val Val Leu Thr Thr Thr Arg Asp Tyr Phe Asp Tyr
          100          105          110

Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 57

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de MD707-3

<400> 57

```

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ala Pro Leu Ser Val Ser Val Thr Pro Gly
1           5           10           15

Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Thr Val
          20           25           30

Lys Gly Ile Thr Ser Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser
          35           40           45

```

ES 2 737 307 T3

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Lys Val Glu Thr Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Phe
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro His Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg

<210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PEPT1

<400> 58

Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu
1 5 10 15

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PEPT2

<400> 59

Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser
1 5 10 15

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PEPT3

<400> 60

Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr
1 5 10 15

<210> 61
<211> 15
<212> PRT

ES 2 737 307 T3

	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> PEPT4
5	<400> 61
	Ala Glu Leu Asp Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu 1 5 10 15
10	<210> 62 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
15	<220> <223> PEPT5 <400> 62
	Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser 1 5 10 15
20	<210> 63 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
25	<220> <223> PEPT6 <400> 63
	Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln His Ser Leu 1 5 10 15
35	<210> 64 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> PEPT7 <400> 64
	Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln His Ser Leu Thr Cys Ala Phe 1 5 10 15
45	<210> 65 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial
50	<220> <223> PEPT8 <400> 65
55	

ES 2 737 307 T3

Asn	Gly	Ser	Gln	His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp
1				5					10					15

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPT9

<400> 66

His	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr
1				5					10					15

<210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPT10

<400> 67

Cys	Ala	Phe	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe
1				5					10					15

<210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPT11

<400> 68

Asp	Pro	Asp	Val	Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly
1				5					10					15

<210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPT12

<400> 69

Asn	Thr	Thr	Asn	Leu	Glu	Phe	Glu	Ile	Cys	Gly	Ala	Leu	Val	Glu
1				5					10					15

<210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 737 307 T3

	<220>	
	<223> PEPT13	
5	<400> 70	
	Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys Leu	
	1 5 10 15	
10	<210> 71	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> PEPT14	
	<400> 71	
	Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys	
	1 5 10 15	
20	<210> 72	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> PEPT15	
	<400> 72	
30	Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile	
	1 5 10 15	
35	<210> 73	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> PEPT16	
	<400> 73	
	Lys Cys Leu Asn Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu	
	1 5 10 15	
45	<210> 74	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> PEPT17	
	<400> 74	

ES 2 737 307 T3

Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe
1 5 10 15

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PEPT18

<400> 75

Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly
1 5 10 15

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PEPT19

<400> 76

Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile
1 5 10 15

<210> 77
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PEPT20

<400> 77

Lys Lys Phe Leu Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val
1 5 10 15

<210> 78
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PEPT21

<400> 78

Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 79
<211> 15

	<212> PRT																														
	<213> Secuencia artificial																														
5	<220>																														
	<223> PEPT22																														
	<400> 79																														
	<table><tr><td>Ser</td><td>Asn</td><td>Ile</td><td>Cys</td><td>Val</td><td>Lys</td><td>Val</td><td>Gly</td><td>Glu</td><td>Lys</td><td>Ser</td><td>Leu</td><td>Thr</td><td>Cys</td><td>Lys</td></tr><tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>15</td></tr></table>	Ser	Asn	Ile	Cys	Val	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	1				5					10					15
Ser	Asn	Ile	Cys	Val	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys																	
1				5					10					15																	
10	<210> 80																														
	<211> 15																														
	<212> PRT																														
	<213> Secuencia artificial																														
15	<220>																														
	<223> PEPT23																														
	<400> 80																														
20																															
	<table><tr><td>Val</td><td>Lys</td><td>Val</td><td>Gly</td><td>Glu</td><td>Lys</td><td>Ser</td><td>Leu</td><td>Thr</td><td>Cys</td><td>Lys</td><td>Lys</td><td>Ile</td><td>Asp</td><td>Leu</td></tr><tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>15</td></tr></table>	Val	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	1				5					10					15
Val	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu																	
1				5					10					15																	
	<210> 81																														
	<211> 15																														
25	<212> PRT																														
	<213> Secuencia artificial																														
	<220>																														
	<223> PEPT24																														
30	<400> 81																														
	<table><tr><td>Glu</td><td>Lys</td><td>Ser</td><td>Leu</td><td>Thr</td><td>Cys</td><td>Lys</td><td>Lys</td><td>Ile</td><td>Asp</td><td>Leu</td><td>Thr</td><td>Thr</td><td>Ile</td><td>Val</td></tr><tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>15</td></tr></table>	Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	1				5					10					15
Glu	Lys	Ser	Leu	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val																	
1				5					10					15																	
35	<210> 82																														
	<211> 15																														
	<212> PRT																														
	<213> Secuencia artificial																														
40	<220>																														
	<223> PEPT25																														
	<400> 82																														
	<table><tr><td>Thr</td><td>Cys</td><td>Lys</td><td>Lys</td><td>Ile</td><td>Asp</td><td>Leu</td><td>Thr</td><td>Thr</td><td>Ile</td><td>Val</td><td>Lys</td><td>Pro</td><td>Glu</td><td>Ala</td></tr><tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>15</td></tr></table>	Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Ala	1				5					10					15
Thr	Cys	Lys	Lys	Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Ala																	
1				5					10					15																	
45	<210> 83																														
	<211> 15																														
	<212> PRT																														
50	<213> Secuencia artificial																														
	<220>																														
	<223> PEPT26																														
55	<400> 83																														

ES 2 737 307 T3

Ile	Asp	Leu	Thr	Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu
1				5					10					15

<210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPT27

<400> 84

Thr	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPT28

<400> 85

Pro	Glu	Ala	Pro	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala
1				5					10					15

<210> 86
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPT29

<400> 86

Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Val
1				5					10					15

<210> 87
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPT30

<400> 87

Val	Ile	Tyr	Arg	Glu	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Val	Val	Thr	Phe	Asn
1				5					10					15

<210> 88
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 737 307 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PEPT31

<400> 88

Glu	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Val	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu
1				5					10					15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PEPT32

<400> 89

Asp	Phe	Val	Val	Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr
1				5					10					15

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PEPT33

<400> 90

Thr	Phe	Asn	Thr	Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu
1				5					10					15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PEPT34

<400> 91

Ser	His	Leu	Gln	Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val
1				5					10					15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PEPT35

<400> 92

ES 2 737 307 T3

		Lys	Lys	Tyr	Val	Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln
		1				5					10					15
5		<210> 93 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
10		<220> <223> PEPT36 <400> 93														
		Lys	Val	Leu	Met	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu
		1				5					10					15
15		<210> 94 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
20		<220> <223> PEPT37 <400> 94														
25		His	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu	Asn	Lys	Trp	Thr
		1				5					10					15
30		<210> 95 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
35		<220> <223> PEPT38 <400> 95														
		Tyr	Arg	Gln	Glu	Lys	Asp	Glu	Asn	Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu
		1				5					10					15
40		<210> 96 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
45		<220> <223> PEPT39 <400> 96														
50		Lys	Asp	Glu	Asn	Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys
		1				5					10					15
55		<210> 97 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial														

<220>
<223> PEPT40

<400> 97

5

Lys	Trp	Thr	His	Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu
1				5					10					15

<210> 98
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> PEPT41

15

<400> 98

Val	Asn	Leu	Ser	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu
1				5					10					15

20

<210> 99
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> PEPT42

<400> 99

Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala
1				5					10					15

30

<210> 100
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> PEPT43

40

<400> 100

Thr	Leu	Leu	Gln	Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile
1				5					10					15

45

<210> 101
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> PEPT44

<400> 101

Arg	Lys	Leu	Gln	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser
1				5					10					15

5	<210> 102 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> PEPT45																														
10	<400> 102 <table><tr><td>Pro</td><td>Ala</td><td>Ala</td><td>Met</td><td>Tyr</td><td>Glu</td><td>Ile</td><td>Lys</td><td>Val</td><td>Arg</td><td>Ser</td><td>Ile</td><td>Pro</td><td>Asp</td><td>His</td></tr><tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td>15</td><td></td></tr></table>	Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	1				5					10				15	
Pro	Ala	Ala	Met	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His																	
1				5					10				15																		
15	<210> 103 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> PEPT46																														
20	<400> 103 <table><tr><td>Tyr</td><td>Glu</td><td>Ile</td><td>Lys</td><td>Val</td><td>Arg</td><td>Ser</td><td>Ile</td><td>Pro</td><td>Asp</td><td>His</td><td>Tyr</td><td>Phe</td><td>Lys</td><td>Gly</td></tr><tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td>15</td><td></td></tr></table>	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	1				5					10				15	
Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly																	
1				5					10				15																		
25	<210> 104 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> PEPT47																														
30	<400> 104 <table><tr><td>Val</td><td>Arg</td><td>Ser</td><td>Ile</td><td>Pro</td><td>Asp</td><td>His</td><td>Tyr</td><td>Phe</td><td>Lys</td><td>Gly</td><td>Phe</td><td>Trp</td><td>Ser</td><td>Glu</td></tr><tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td>15</td><td></td></tr></table>	Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	1				5					10				15	
Val	Arg	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu																	
1				5					10				15																		
35	<210> 105 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> PEPT48																														
40	<400> 105 <table><tr><td>Pro</td><td>Asp</td><td>His</td><td>Tyr</td><td>Phe</td><td>Lys</td><td>Gly</td><td>Phe</td><td>Trp</td><td>Ser</td><td>Glu</td><td>Trp</td><td>Ser</td><td>Pro</td><td>Ser</td></tr><tr><td>1</td><td></td><td></td><td></td><td>5</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td>10</td><td></td><td></td><td></td><td>15</td><td></td></tr></table>	Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser	1				5					10				15	
Pro	Asp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Phe	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Pro	Ser																	
1				5					10				15																		
45	<210> 106 <211> 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220>																														
50	<220>																														
55	<220>																														

ES 2 737 307 T3

<223> PEPT49

<400> 106

5

Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg
1 5 10 15

<210> 107

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PEPT50

15

<400> 107

Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile
1 5 10 15

<210> 108

20

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> PEPT51

<400> 108

Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser
1 5 10 15

30

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PEPT52

<400> 109

40

Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp
1 5 10 15

45

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende las siguientes CDR:

- 5 - VH-CDR1 cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VH3-CDR1 de la SEQ ID NO: 14;
- VH-CDR2 cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VH3-CDR2 de la SEQ ID NO: 16;
- VH-CDR3, cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VH3-CDR3 de la SEQ ID NO: 18;
- VL-CDR2, cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VL3-CDR2 de la SEQ ID NO: 22;
- VL-CDR3, cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VL3-CDR3 de la SEQ ID NO: 24;
- 10 y
- VL-CDR1, cuya secuencia de aminoácidos es Effi3-VL3-CDR1 de la SEQ ID NO: 20 o la secuencia de aminoácidos que es Effi3-VL4-CDR1 de la SEQ ID NO: 26,

en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente al dominio extracelular de CD127 humano y no es un antagonista de CD127.

2. Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una o más de las siguientes características:

- 20 - dicho anticuerpo o fragmento no inhibe la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 humana en células que expresan el IL7-R;
- dicho anticuerpo o fragmento no inhibe la secreción de TARC estimulada por TSLP humana en células que expresan el TSLP-R;
- dicho anticuerpo o fragmento no es un agonista de CD127 humano;
- 25 - dicho anticuerpo o fragmento no aumenta la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 humana en células que expresan el IL7-R;
- dicho anticuerpo o fragmento no aumenta la secreción de TARC estimulada por TSLP humana en células que expresan el TSLP-R.

3. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada y una cadena ligera en donde:

- la cadena pesada comprende la VH-CDR1 de la secuencia de la SEQ ID NO: 14, la VH-CDR2 de secuencia de la SEQ ID NO: 16, la VH-CDR3 de la secuencia de la SEQ ID NO: 18, y
- 35 - la cadena ligera comprende la VL-CDR1 de la secuencia de la SEQ ID NO: 20 o 26, la VL-CDR2 de la secuencia de la SEQ ID NO: 22, la VL-CDR3 de la secuencia de la SEQ ID NO: 24.

4. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 3, en donde la cadena pesada y/o la cadena ligera comprenden en sus marcos uno o varios de los siguientes restos de aminoácidos, y en particular todos los siguientes restos de aminoácidos en las posiciones identificadas con respecto a la numeración de Kabat:

- 40 - en la secuencia de VH: en la posición 3 un resto Q, en la posición 15 un resto G, en la posición 16 un resto G, en la posición 21 un resto T, en la posición 50 un resto T, en la posición 87 un resto S, en la posición 91 un resto E, en la posición 95 un resto T, en la posición 118 un resto L, y/o
- 45 - en la secuencia de VL: en la posición 7 un resto S, en la posición 9 un resto S, en la posición 11 un resto L, en la posición 12 un resto P, en la posición 18 un resto P, en la posición 47 un resto Q, en la posición 50 un resto K, en la posición 68 un resto S, en la posición 73 un resto G o un resto E, preferentemente un resto E, en la posición 82 un resto R, en la posición 85 un resto A, en la posición 90 un resto T.

5. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 3 o 4, que comprende:

- 50 (i) una cadena pesada y una cadena ligera en donde la cadena ligera comprende la VL4-CDR1 de la SEQ ID NO: 26 y tiene un resto de aminoácido en la posición 73 que es un resto G o
- (ii) una cadena pesada y una cadena ligera en donde la cadena ligera comprende la VL3-CDR1 de la SEQ ID NO: 20 y tiene un resto de aminoácido en la posición 73, que es un resto E.

6. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 4, en donde la cadena pesada y/o la cadena ligera comprenden en sus marcos todos los siguientes restos de aminoácidos:

- 60 - en la secuencia de VH: en la posición 3 un resto Q, en la posición 15 un resto G, en la posición 16 un resto G, en la posición 21 un resto T, en la posición 80 un resto T, en la posición 87 un resto S, en la posición 91 un resto E, en la posición 95 un resto T, en la posición 118 un resto L, y/o
- en la secuencia de VL: en la posición 7 un resto S, en la posición 9 un resto S, en la posición 11 un resto L, en la posición 12 un resto P, en la posición 18 un resto P, en la posición 47 un resto Q, en la posición 50 un resto K, en la posición 68 un resto S, en la posición 73 un resto E, en la posición 82 un resto R, en la posición 85 un
- 65 resto A, en la posición 90 un resto T.

7. Un anticuerpo, o fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende o consiste en:

- una cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de Effi3-VH3, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 2; y
- una cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de Effi3-VL3, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o la secuencia de Effi3-VL4 cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

8. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene actividad citotóxica, en particular, actividad ADCC, en células CD127 positivas, especialmente en células CD127 positivas humanas, y opcionalmente posterior a la unión de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a CD127 recluta de células inmunitarias efectoras que expresan receptores de Fc, siendo dicho reclutamiento dependiente de Fc.

9. Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es uno de los siguientes fragmentos:

- Fragmento Fv que consiste en las cadenas VL y VH asociadas entre sí por interacciones hidrófobas;
- Fragmento dsFv en el que el heterodímero VH:VL está estabilizado por un enlace disulfuro;
- Fragmento scFv en el que las cadenas VL y VH están conectadas entre sí a través de un enlazador peptídico flexible, formando así una proteína monocatenaria;
- Fragmento Fab que es un fragmento monomérico que comprende la cadena L completa y un fragmento VH-CH1 de la cadena H, unidos entre sí a través de un enlace disulfuro;
- Fragmento Fab';
- Fragmento F(ab')₂ que comprende dos fragmentos Fab', y adicionalmente una porción de la región de bisagra de un anticuerpo.

10. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que reconoce un polipéptido que consiste en o que comprende el epítipo con la secuencia de la SEQ ID NO: 55 y opcionalmente se genera contra dicho polipéptido.

11. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado, que comprende o consiste en:

- una cadena pesada que comprende la región constante de IgG1m-E333A cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 28, en particular una cadena pesada de Effi3-VH3-IgG1m-E333A cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 42 y
- una cadena ligera que comprende la región constante de CLkappa, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 34, en particular, una cadena ligera de Effi3-VL3-CLkappa, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de ID NO: 50 o de Effi3-VL4-CLkappa, cuya la secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 48.

12. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado, que comprende o consiste en:

- una cadena pesada que comprende la región constante de IgG4m-S228P, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 30, o la región constante de IgG2b cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 32 y
- una cadena ligera que comprende la región constante de CLkappa cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 34 o la secuencia constante de CLlambd cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 36.

13. Una molécula quimérica que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que es una molécula compleja que tiene una pluralidad de dominios funcionales que colectivamente proporcionan funciones de reconocimiento, unión, anclaje, señalización a dicha molécula, en particular, siendo dicha molécula compleja un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende:

- (i) un ectodominio que es un fragmento scFv de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12
 - (ii) un dominio transmembrana para anclar en una membrana celular, y
 - (iii) un endodominio que comprende al menos un dominio de señalización intracelular,
- siendo (i), (ii) y (iii) una o más moléculas recombinantes asociadas, en particular una o más proteínas de fusión.

14. Un receptor de antígeno quimérico según la reivindicación 13, que comprende al menos 2, ventajosamente, al menos 3 dominios de señalización en los que los dominios de señalización permiten colectivamente al menos una de

las siguientes propiedades:

- Iniciación de la activación de linfocitos T, tal como el proporcionado por el dominio citoplasmático ζ de CD3
- citotoxicidad mediada por linfocitos T,
- amplificación de la señal de activación de linfocitos T o coestimulación de dicha señal, tal como lo proporcionan los elementos coestimuladores derivados de receptores tales como 4-1BB, CD28 o ICOS o OX40.

15. Un polinucleótido, en particular un polinucleótido aislado, que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en particular un vector que comprende como un inserto, un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

16. Un polinucleótido según la reivindicación 15, que comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21 y 23, o las secuencias de las SEQ ID NO: 13, 15, 17, 25, 21 y 23, en particular que comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 1 y 3 o las secuencias de las SEQ ID NO: 1 y 5, en particular, que comprende las secuencias de las SEQ ID NO: 41 y 47 o las secuencias de las SEQ ID NO: 41 y 49.

17. Una célula que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 13, o un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 14, o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en particular, un linfocito T.

18. Un método de preparación del receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende las etapas de:

- a. proporcionar un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en particular un fragmento scFv,
- b. recombinar dicho polinucleótido de a) en su extremo C-terminal con polinucleótidos que codifican de N-terminal a C-terminal un dominio transmembrana y al menos uno, en particular, dos dominios de señalización intracelular adecuados para proporcionar señales estimulantes a una célula, en particular a un linfocito T, más particularmente un linfocito T humano,
- c. expresar la molécula recombinante obtenida en b) en una célula, especialmente en un linfocito T, más particularmente un linfocito T humano,
- d. seleccionar el receptor de antígeno quimérico producido por sus propiedades después de ponerlo en contacto con una célula que expresa CD127 humano.

19. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 13, un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 14, una célula de acuerdo con la reivindicación 17 o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15 o 16.

20. Un medio terapéutico de combinación, en particular un producto de combinación, que comprende como principios activos:

- un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 13, un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 14, una célula de acuerdo con la reivindicación 17 o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15 o 16 y,
- al menos un agente terapéutico adicional seleccionado del grupo de agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, agentes de cirugía, agentes inmunoterapéuticos, probióticos y antibióticos,

en donde dichos principios activos se formulan para la terapia separada, simultánea o de combinación, en particular para su uso combinado o secuencial.

21. Un medio terapéutico de combinación de acuerdo con la reivindicación 20 que es adecuado para la administración a un paciente humano que lo necesite, y que comprende como principios activos: (I) un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 13, un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 14, una célula según la reivindicación 17 o un polinucleótido según la reivindicación 15 o 16 y (ii) un agente inmunoterapéutico adicional, en particular un agente inmunoterapéutico que implica linfocitos T, tal como un linfocito T que lleva una molécula CAR tal como se define en la reivindicación 13 o 14 o una molécula CAR que se dirige a un receptor o antígeno celular, tal como, CD19, CD20 CD52 o Her2.

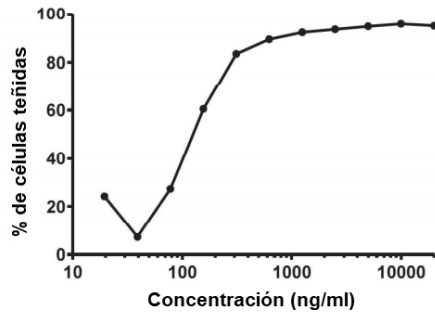
22. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 13, un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 14, una célula de acuerdo con la reivindicación 17 o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, para su uso como un medicamento.

23. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 13, un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 14, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, una célula de acuerdo con la reivindicación 17, una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19, o el medio terapéutico de combinación de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, para su uso en el tratamiento del cáncer, en particular de cáncer asociado con células CD127+, más particularmente de cáncer relacionado con la proliferación de células CD127 positivas y/o con una infiltración de células CD127 positivas.
24. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 13, un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 14, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, o una célula de acuerdo con la reivindicación 17 para uso según la reivindicación 23 en el tratamiento del cáncer seleccionado del grupo de cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, o para el tratamiento de un linfoma cutáneo de linfocitos T, como el linfoma de Sezary, o para el tratamiento de la leucemia linfoblastoide aguda con mutación de ganancia de la vía de IL7-R/TSPL y mesotelioma.
25. Un método para crear un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que comprende inmunizar a un animal no humano, en particular a un mamífero no humano, contra un polipéptido que consiste en el epítipo con la secuencia de la SEQ ID NO: 55 y en particular recolectar el suero resultante de dicho animal no humano inmunizado para obtener anticuerpos dirigidos contra dicho polipéptido,
- en donde el método comprende además la etapa de seleccionar un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular de CD127 y que presenta al menos una de las siguientes propiedades:
- no es un antagonista de CD127 y no inhibe la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 en células que expresan IL7-R y/o,
 - no inhibe la secreción de TARC estimulada por TSPLP en células que expresan la TSPLP-R y/o,
 - no aumenta la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 en células que expresan IL7-R y/o,
 - no aumenta la secreción de TARC estimulada por TSPLP en células que expresan el TSPLP-R.
26. Un método de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el anticuerpo tiene las siguientes propiedades:
- se une específicamente al dominio extracelular de CD127 y
 - no es un antagonista de CD127 y
 - no inhibe la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 en células que expresan el IL7-R y
 - no inhibe la secreción de TARC estimulada por TSPLP en las células que expresan el TSPLP-R y
 - no es un agonista de CD127 y,
 - no aumenta la fosforilación de STAT5 inducida por IL-7 en células que expresan IL7-R y
 - no aumenta la secreción de TARC estimulada por TSPLP en células que expresan el TSPLP-R.
27. Un método de diagnóstico *in vitro* o *ex vivo*, en particular, un método de diagnóstico adecuado para su uso en medicina personalizada, más particularmente en un diagnóstico complementario, en donde se usa un anticuerpo anti-CD127 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 13 o un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 14 para la detección de células CD127+ en una muestra previamente obtenida de un sujeto y opcionalmente para la cuantificación de la expresión de CD127.
28. Uso de un anticuerpo anti-CD127 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o una molécula quimérica de acuerdo con la reivindicación 13 o un receptor de antígeno quimérico de acuerdo con la reivindicación 14, en la fabricación de un medicamento adecuado para su uso en un ensayo de diagnóstico, en particular para su uso en medicina personalizada, o en una prueba de diagnóstico complementaria.
29. Un método de determinación *in vitro* o *ex vivo* de la presencia de células CD127+ en una muestra obtenida previamente de un sujeto que comprende determinar la presencia de CD127 como un biomarcador que predice la respuesta de un sujeto a un tratamiento, en particular, la respuesta de un sujeto diagnosticado con un cáncer en el que dicho método comprende:
- determinar el nivel de expresión de CD127 en una muestra tumoral de un sujeto utilizando un anticuerpo anti-CD127 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una molécula quimérica según la reivindicación 13 o un receptor de antígeno quimérico según la reivindicación 14 y
 - comparar el nivel de expresión de CD127 con un valor representativo de un nivel de expresión de CD127 en una población del sujeto que no responde,

en donde un nivel de expresión más alto de CD127 en la muestra de tumor del sujeto es indicativo para un sujeto que responderá al tratamiento.

Figura 1

A.



B.

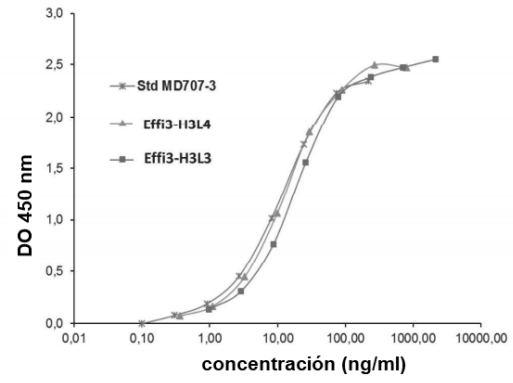


Figura 2

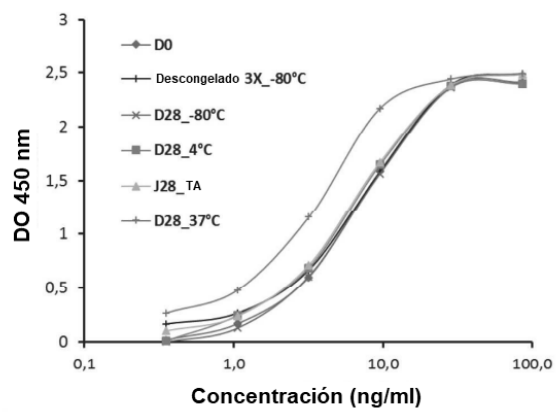


Figura 3

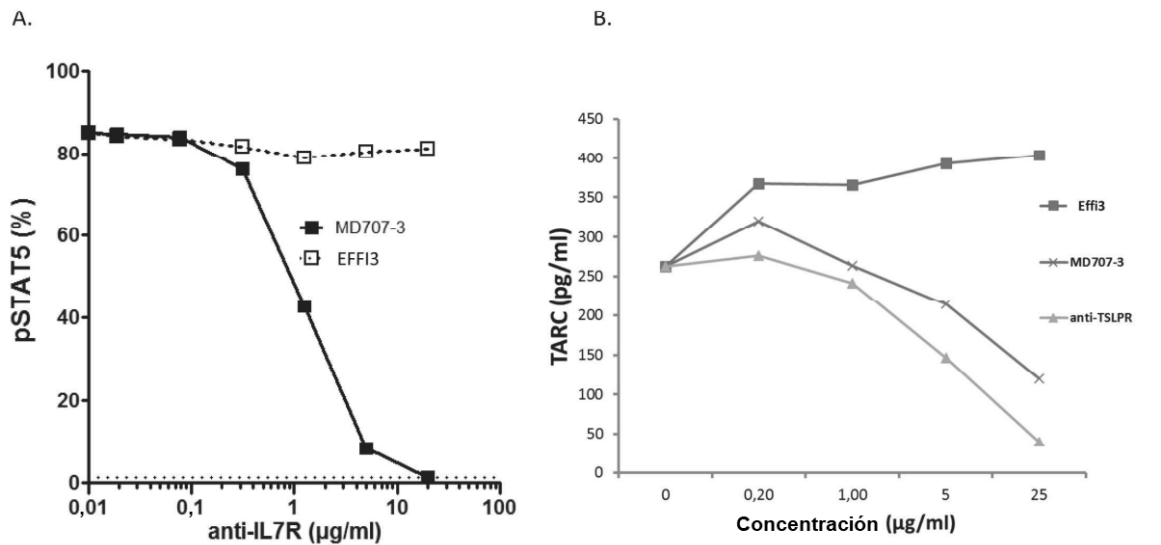


Figura 4

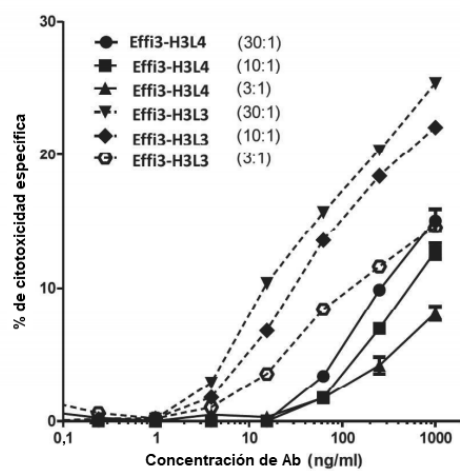


Figura 5

ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNTTNLEFE
ICGALVEVKCLNFRKLQEIFYETKKFLLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTIVKPE
APFDLSVIYREGANDFVVTFNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWITHV
NLSSTKLTLQKRLQPAAMYKVRIPDHYFKGFWSEWSPSYFRTPEINNSS
GEMD

Figura 6

MLVLQWVLVTALFQGVHCAVQLVESGGGLVQPGGSLKITCAASGFTTNAAMYWVRQAPGKGLEWVARIRTK
 ANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKSTVYLQMDSVKTEDATYYCIVVLTTRDYFDYWGGVLTVSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 7

MKFPAQFLGLIVLCIPGATGDIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQDLLTVKGITSLYWFLQKPGQSPKLLIYRMSN
 RD SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFIYPHTFGAGTKI FLKRTVAAPSVFIFPPSDEQIKSGTAS
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
 FNRGEC