



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 973 474**

⑮ Int. Cl.:  
**C07K 16/28**  
(2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2014 E 21190497 (4)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023 EP 3971212**

⑭ Título: **Proteínas de enlace a antígeno del receptor de oncostatina M**

⑩ Prioridad:

**30.05.2013 US 201361829082 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.06.2024**

⑬ Titular/es:

**KINIKSA PHARMACEUTICALS, LTD. (100.0%)**  
Clarendon House, 2 Church Street  
Hamilton HM 11, BM

⑭ Inventor/es:

**ARNETT, HEATHER A.;**  
**ESCOBAR, SABINE S.;**  
**KING, CHADWICK T.;**  
**LIM, AI CHING;**  
**NARAYANAN, SARAVANAKUMAR;**  
**WEINREB, PAUL H. y**  
**PEDERSON, NELS E.**

⑭ Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

### Observaciones:

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

**ES 2 973 474 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

Proteínas de enlace a antígeno del receptor de oncostatina M

## 5 ANTECEDENTES

**[0001]** La oncostatina M (OSM) y la interleucina-31 (IL-31) son miembros de la superfamilia IL-6 y comparten una subunidad receptora, el receptor  $\beta$  de oncostatina M (OSMR) (Dillon et al., *Nat. Immunol.* 5(7): 752-60, 2004). Todos los miembros de esta familia, excepto la IL-31, comparten la cadena común de la glicoproteína 130 (gp130) en sus complejos receptores multiméricos. OSM envía señales a través de un complejo receptor heterodimérico que contiene OSMR y gp130, mientras que IL-31 utiliza un receptor similar a gp130, IL-31R, en combinación con OSMR (Dillon et al., *supra*; Dreuw et al., *J. Biol. Chem.* 279(34): 36112-20, 2004). En general, OSMR y gp130 se expresan de manera bastante ubicua en tejidos y tipos de células, y pueden inducirse bajo una variedad de condiciones de estimulación. La expresión de IL-31R parece estar relativamente más restringida y estrechamente regulada. Tanto en humanos como en ratones, la expresión del ARNm de IL-31R es detectable en niveles bajos en tejidos tales como la tráquea, el músculo esquelético, el timo y la médula ósea (Dillon et al., *supra*). Aunque el nivel de expresión es marcadamente diferente, tanto IL-31R como OSMR se coexpresan en una multitud de tejidos, incluidas la piel y las células epiteliales intestinales, lo que sugiere que esos tejidos deberían responder a IL-31 (Dillon et al., *supra*; Dambacher et al., *Gut* 56(9): 1257-65, 2007). Mientras que OSMR se expresa constitutivamente en el pulmón en las células epiteliales, la expresión de IL-31R es de niveles insignificantes a bajos en el tejido pulmonar, pero se regula positivamente con diversos métodos de provocación de las vías respiratorias (Dillon et al., *supra*; Jawa et al., *J. Interferon Cytokine Res.* 28(4): 207-19, 2008).

**[0002]** Secretadas principalmente por linfocitos T, macrófagos y neutrófilos, OSM e IL-31 están reguladas positivamente en una variedad de estados patológicos que involucran inflamación. La OSM ha estado implicada en diversas funciones biológicas, incluida la formación de hueso, la degradación del cartílago, la absorción de colesterol, el dolor y la inflamación (Cawston et al., *Arthritis Rheum.* 41(10):1760-71, 1998; Hasegawa et al., *Rheumatology (Oxford)* 38(7): 612-7, 1999; Levy et al., *J. Hepatol.* 32(2): 218-26, 2000; Manicourt et al., *Arthritis. Rheum.* 43(2): 281-8, 2000; de Hooge et al., *Am J. Pathol.* 160(5):1733-43, 2002; Luzina et al., *Arthritis Rheum* 48(8): 2262-74, 2003; Morikawa et al., *J. Neurosci.* 24(8): 1941-7, 2004; Kong et al., *J. Lipid Res.* 46(6): 1163-71, 2005). Se ha demostrado que OSM es un potente modulador de la matriz extracelular (ECM) en una variedad de contextos, lo que sugiere que OSM es capaz de mediar consecuencias patológicas aparentemente opuestas, incluida la fibrosis (un exceso de ECM) y la degradación del cartílago (una ruptura de ECM). Dependiendo del tipo de tejido y del entorno ambiental, se han observado ambos efectos cuando se ha sobreexpresado OSM o se ha administrado exógenamente en pulmones o articulaciones de ratones, respectivamente (Richards et al., *Biochem. Soc. Trans.* 30(2): 107- 11, 2002; Hui et al., *Arthritis Rheum.* 48(12): 3404-18, 2003; Rowan et al., *Am. J. Pathol.* 162(6): 1975-84, 2003). Además, se ha demostrado previamente que OSM está regulada positivamente en patologías humanas donde existen este tipo de consecuencias (Cawston et al., *supra*; Hasegawa et al., *supra*; Levy et al., *supra*; Manicourt et al., *supra*; Luzina et al., *supra*). OSM, una citocina predominantemente de acción local, está regulada positivamente en el líquido sinovial de las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide (AR) (Cawston et al., *supra*; Manicourt et al., *supra*), en el líquido del lavado broncoalevolar (BAL, por sus siglas en inglés) de pacientes con enfermedad pulmonar intersticial asociada a esclerodermia (Luzina et al., *supra*), fibrosis pulmonar idiopática (FPI), y en los hígados de pacientes con cirrosis (Levy et al., *supra*). El impacto propuesto por OSM en la ECM se puede atribuir en parte a la capacidad de OSM para cambiar el equilibrio entre las metaloproteínasas de matriz (MPM) y los inhibidores tisulares de MPM (TIMP, por sus siglas en inglés). Los TIMP se unen a las MPM en una proporción de 1:1 con una alta afinidad que resulta en una pérdida de actividad proteolítica de las MPM. Se ha demostrado previamente que TIMP-1 y TIMP-3 están regulados diferencialmente por OSM, lo que resulta en un aumento de TIMP-1 y una disminución de TIMP-3 (Gatsios et al., *Eur. J. Biochem.* 241(1): 56-63, 1996). Además de regular la digestión de los componentes de la matriz extracelular, las MPM también están implicadas en la escisión y posterior activación de una serie de proteínas, incluido el TGF- $\beta$ , una potente citocina profibrótica (Leask et al., *FASEB J.* 18(7): 816-27, 2004). También se ha informado que OSM es capaz de inducir directamente la transcripción de colágeno tipo I *in vitro* (Hasegawa et al., *J. Rheumatol.* 25(2): 308-13, 1998). Jazayeri et al. (*Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2010; 25(12): 865-873) analiza los inhibidores de la señalización OSMR, mientras que US 2006/171951, Diveu et al. (*European Cytokine Network*, 2004; 15(4): 291-302) y Pavle et al. (*Oncogene*, 2003; 22(50): 8117-8124) analizan los antagonistas de la señalización OSMR.

**[0003]** Se ha encontrado expresión tanto de OSM como de IL-31 en la piel de pacientes con psoriasis y dermatitis atópica, y las mutaciones en OSMR e IL-31R se han relacionado con la amiloidosis cutánea sistémica. La sobreexpresión transgénica de IL-31 en todo el sistema indujo una respuesta inflamatoria pruriginosa en la piel de ratones. Tanto OSM como IL-31 envían señales a través de OSMR en neuronas donde se ha sugerido que promueven respuestas nociceptivas y pruriginosas.

**[0004]** En conjunto, estos vínculos con las enfermedades humanas y la capacidad de OSM e IL-31 para promover una amplia gama de patologías, que incluyen al menos inflamación, remodelación de la matriz extracelular, dolor y prurito, sugieren que el bloqueo de OSMR es un objetivo útil para la intervención terapéutica en muchas enfermedades y trastornos asociados con OSMR.

## RESUMEN

**[0005]** En el presente documento se describen anticuerpos de unión al receptor de oncostatina M (OSMR) que tienen propiedades susceptibles de producción comercial y uso terapéutico en humanos. La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Específicamente, la invención proporciona un anticuerpo de unión a OSMR para usar en un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con señalización mediada por OSMR, en donde la enfermedad o trastorno se selecciona de enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, en donde el anticuerpo anti-OSMR comprende (i) un dominio variable de cadena ligera que comprende una región 1 determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR1) como se establece en SEQ ID NO: 31, una región 2 determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR2) como se establece en SEQ ID NO: 34, y una región 3 determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR3) como se establece en SEQ ID NO: 37, y (ii) un dominio variable de cadena pesada que comprende una región 1 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1) como se establece en la SEQ ID NO: 13, una región 2 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR2) como se establece en la SEQ ID NO: 16, y una región 3 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR3) como se establece en la SEQ ID NO: 19, en la que el anticuerpo de unión a OSMR inhibe la unión de la oncostatina M humana (OSM) y la interleucina 31 humana (IL-31) a la OSMR humana, y reduce la señalización mediada por OSM humana y IL-31 humana en células que expresan OSMR humana.

**[0006]** En algunas formas de realización, el anticuerpo OSMR para usar con la invención comprende a) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:28; b) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10; o c) el dominio variable de cadena ligera de a) y el dominio variable de cadena pesada de b).

**[0007]** En algunos aspectos, el anticuerpo OSMR para usar con la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 %, al menos un 95 %, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:28 y una variable de cadena pesada, dominio que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10. En algunos aspectos, el anticuerpo OSMR para usar con la invención comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la relación de secuencia definida anteriormente con SEQ ID NO:10 y puede contener opcionalmente un aminoácido distinto de asparagina (p. ej., ácido aspártico) en la posición correspondiente a la posición 73 en SEQ ID NO: 10. En tales formas de realización, el dominio variable de cadena pesada comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54.

**[0008]** En algunos aspectos, el anticuerpo OSMR para uso con la invención comprende a) un dominio variable de cadena ligera que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:28; b) un dominio variable de cadena pesada que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10; o c) el dominio variable de cadena ligera de a) y el dominio variable de cadena pesada de b).

**[0009]** En algunos aspectos, el anticuerpo OSMR para uso con la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:28 y un dominio variable de cadena pesada que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10. En algunos aspectos, el anticuerpo OSMR comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la relación de secuencia definida anteriormente con SEQ ID NO:10 y puede contener opcionalmente un aminoácido distinto de asparagina (p. ej., ácido aspártico) en la posición correspondiente a la posición 73 en SEQ ID NO:10. En tales formas de realización, el dominio variable de cadena pesada comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:54. El anticuerpo OSMR para usar con la invención comprende el dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 expuestas en las SEQ ID NO: 31, 34 y 37, respectivamente, y el dominio variable de cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2 y Las secuencias HCDR3 expuestas en SEQ ID NO: 13, 16 y 19, respectivamente, pueden contener opcionalmente un dominio variable de cadena pesada que comprende un aminoácido distinto de asparagina (p. ej., ácido aspártico) en la posición correspondiente a la posición 73 en SEQ ID NO:10. En tales aspectos, el dominio variable de cadena pesada comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:54.

**[0010]** En algunas formas de realización, el anticuerpo OSMR para usar con la invención puede unirse a OSMR humano con una afinidad menor o igual a  $1 \times 10^{-10}$  M. En algunos aspectos, el anticuerpo OSMR para usar con la invención comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID:25 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:51.

**[0011]** También se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos o ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido, en donde dicho polinucleótido codifica uno o más polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de:

65 a) una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es al menos 95 % idéntica al conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en SEQ ID NO:28;

- b) una secuencia de dominio variable de cadena pesada que es al menos 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10;
  - c) una secuencia de dominio variable de cadena ligera que tiene no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:28;
  - d) una secuencia de dominio variable de cadena pesada que tiene no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10.

[0012] También se proporcionan en el presente documento ácidos nucleicos o ácidos nucleicos aislados que comprenden un polinucleótido, en donde dicho polinucleótido codifica uno o más polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de:

- 15 a) un dominio variable de cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2, CDR3, en el que la secuencia LCDR1 se establece en la SEQ ID NO:31, la secuencia LCDR2 se establece en la SEQ ID NO:34 y la secuencia LCDR3 se establece en SEQ ID NO: 37; y  
b) un dominio variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, en el que la secuencia HCDR1 se establece en la SEQ ID NO:13, la secuencia HCDR2 se establece en la SEQ ID NO:16 y la secuencia HCDR3 se establece en SEQ ID NO: 19.

20 Un ácido nucleico ejemplar o un ácido nucleico aislado codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:54.

Un ácido nucleico ejemplar o un ácido nucleico aislado codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:51.

**[0013]** En el presente documento se proporciona un ácido nucleico o ácido nucleico aislado que codifica una cadena ligera de anticuerpo y es al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o es 100 % idéntico a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:22. También se proporciona en el presente documento un ácido nucleico o ácido nucleico aislado que codifica una cadena pesada de anticuerpo y es al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o es 100 % idéntico a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 4.

30 **[0014]** También se proporciona en el presente documento la cadena pesada codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:48.

35 [0015] Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 [0016] Los títulos de las secciones utilizados en este documento tienen únicamente fines organizativos y no deben interpretarse como limitativos del tema descrito.

45 [0017] Se pueden usar técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, cultivo y transformación de tejidos, purificación de proteínas, etc. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se pueden realizar de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Los siguientes procedimientos y técnicas pueden realizarse generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la especificación. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manuel, 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con los procedimientos de laboratorio y las técnicas de química analítica, química orgánica y química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se pueden utilizar técnicas estándar para síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración y tratamiento de pacientes.

50

55

OSMR

[0018] Señal OSM e IL-31 a través de OSMR. OSMR es miembro de la familia de receptores de citocinas tipo I. OSMR se heterodimeriza con la glicoproteína 130 (también conocida como gp130, transductor de señal de interleucina 6 (IL6ST), IL6-beta o CD130) para formar OSMR de tipo II. OSMR también se heterodimeriza con el receptor A de IL-31 (IL31RA) para formar el receptor de IL-31 y, por lo tanto, transduce eventos de señalización inducidos por OSM e IL-31. El anticuerpo OSMR para usar con la invención se une a OSMR humano y puede prevenir la señalización mediada por OSM humano y IL-31 humana en células que expresan OSMR.

65 [0019] Las secuencias OSMR humanas son conocidas en la técnica. En diversos aspectos, las secuencias de proteínas OSMR humanas se proporcionan en los números de acceso de GenBank AAI25210, AAI25211, NP\_003990 y EAW55976. En la Tabla 1 se proporciona una secuencia de aminoácidos de OSMR humana ejemplar (SEQ ID NO:

1). La proteína está formada por varios dominios: Los aminoácidos 1-27 corresponden a la secuencia señal que puede escindirse durante el procesamiento de la proteína en células de mamífero; los aminoácidos 28-740 corresponden al dominio extracelular; y los aminoácidos 741-761 corresponden al dominio transmembrana. El anticuerpo OSMR para usar con la invención se une al dominio extracelular de OSMR humano y puede prevenir la interacción de OSM e IL-31 con OSMR.

5 [0020] Las secuencias de OSM humanas son conocidas en la técnica. En diversos aspectos, las secuencias de proteínas OSM humanas se proporcionan en los números de acceso de GenBank CAG30420, CAG46504, NP\_065391, P13725, AAC05173, EAW59864 y AAH11589. En la Tabla 1 se proporciona una secuencia de aminoácidos de OSM humana ejemplar (SEQ ID NO: 39). Los aminoácidos 1-25 corresponden a la secuencia señal; los aminoácidos 26-220 corresponden a la proteína madura; y los aminoácidos 221-252 corresponden a la secuencia propeptídica.

10 [0021] Las secuencias de IL-31 humana son conocidas en la técnica. En diversos aspectos, las secuencias de la proteína IL-31 humana se proporcionan en los números de acceso de GenBank NP\_001014358, AAS86448, AAI32999, AAI33001, Q6EBC2 y EAW98310. En la Tabla 1 se proporciona una secuencia de aminoácidos de IL-31 humana ejemplar (SEQ ID NO: 41). Los aminoácidos 1-23 corresponden a la secuencia putativa de 6 señales.

15 [0022] Las secuencias de IL31RA humano son conocidas en la técnica. En diversos aspectos, las secuencias de la proteína IL31RA humana se proporcionan en los números de acceso de GenBank AAS86447, NP\_001229567 y CBL94051. En la Tabla 1 se proporciona una secuencia de aminoácidos de IL31RA humano (v4, isoforma 3) ejemplar (SEQ ID NO: 43). Los aminoácidos 1-32 corresponden a la secuencia señal; y los aminoácidos 533-553 corresponden a la secuencia transmembrana.

20 [0023] Las secuencias de gp130 humana son conocidas en la técnica. En diversos aspectos, las secuencias de la proteína gp130 humana se proporcionan en los números de acceso de GenBank AAI17403, AAI17405, EAW54936, NP\_002175, ABK41905 y AAA59155. En la Tabla 1 se proporciona una secuencia de aminoácidos de gp130 humana ejemplar (SEQ ID NO: 45). La proteína está formada por varios dominios: los aminoácidos 1-22 corresponden a la secuencia señal; los aminoácidos 23-619 corresponden al dominio extracelular; los aminoácidos 620-641 corresponden al dominio transmembrana; y los aminoácidos 642-918 corresponden al dominio citoplasmático.

Tabla 1

	<b>Secuencia de aminoácidos de OSMR humano (SEQ ID NO:1)</b>
35	MALFAVFQTTFFLTLLSLRTYQSEVLAERLPLTPVSLKVSTNSTRQLHLQWTVHNLP YHQELKMFQIQISRIETSNVIWVGNYSTTVKWNQVLHWSWESELPLECATHFVRIKS LVDDAKFPEPNFWSNWSSWEEVSVDQDSTGQDILFVFPKDKLVEEGTNVTICYVSRNIQ NNVSCYLEGKQIHGEQLDPHTAFNLNSVPFIRNKGNTNIYCEASQGNVSEGMKGIVLF VSKVLEEPKDFSCETEDFKTLHCTWDPGTDALGWSKQPSQSYTLEFSFSGEKKLCTH KNWCNWQITQDSQETYNFTLIAENYLRKRSVNLFLNTHRVLMLNPFNSVNFENVNAT NAIMTWKVHSIRNNFTYLCQIELHGEKGMMQYNVSIKVNGEYFLSELEPATEYMARV RCADASHFWKWSEWSGQNFNTLEAAPSEAPDVWRIVSLEPGNHTVTLFWKPLSKLHA NGKILFYNVVVENLDKPSSELHSIPAPANSTKLILDRCSYQICVIANNSVGASPASVIVI SADPENKEVEEERIAGTEGGFSLSWKPQPGDVIGYVWDWCDHTQDVLGDFQWKNVG PNTTSTVISTDAFRPGVRYDFRIYGLSTKRIACLLEKKTGYSQELAPSDNPHVLVDTLTS HSFTLSWKDYSTESQPGFIQGYHVYLKSKARQCHPRFEKAVLSDGSECKKYKIDNPEE 50 KALIVDNLKPESFYEFFITPFTSAGEGPSATFTKVTTPDEHSSMLIHILLPMVFCVLLIMV MCYLSKSWIKEYCYPDIPDPYKSSILSLIKFKENPHLIIMNVSDCIPDAIEVVSKPEGTKI QFLGTRKSLTETELTKPNLYLLPTEKNHSGPGCICFENLTYNQAASDGS CGHVPVS PKAPSMLGLMTSPENVLKALEKNYMSLGEIPAGETSLNYVSQLASPMFGDKDSLPT PVEAPHCSEYKMQMAVSLRLALPPPTENSSLSSITLLDPGEHYC
55	<b>Secuencia de aminoácidos de OSM humana (SEQ ID NO:39)</b>
60	MGVLLTQRTLSSLVLALLFPMASMAAIGSCSKEYRVLGLQLQKQTDLMQDTSRLLD PYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQLTLNATLGCVLHRLADLEQF LPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNIYCMAQLLDSNTAEPKAGRGA PPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHSVGRVFSKGESPNSRRHSPHQALRK VRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR
65	<b>Secuencia de aminoácidos de IL-31 humana (SEQ ID NO:41)</b>
	MASHSGPSTSVLFLFCCLGGWLASHTLPVRLLRPSDDVQKIVEELQSLSKMLLKDVEE EKGVLVSQLNYTLPCLSPDAQPPNNIHSPAIRAYLKTIRQLDNKSVIDEIIEHLDKLIFQDA PETNISVPTDTHECKRFLTISQQFSECMDLALKSLTSGAQQATT

(Continuación)

5	Secuencia de aminoácidos de IL31RA humano (SEQ ID NO:43)
10	MKLSPQPSCVNLGMMWTALWMLPSLCKFSLAALPAK PENISCVYYYRKNLCTWS PGKETSYTQYTVKRTYAFGEKHDNCTTNSSTSEN RASCSSFLPRITIPDNYTIEVEAENC DGVIKSHMTYWRLENIAKTEPPKIFRKPVLGKRMQIEWIKPELAPVSSDLKYTLRFR TVNSTSWMEVNFAKNRKDNQTYNLTGLQPFT EYVIALRCAVKE SKFWSDWSQEKM GMTEEEAPCGLELWRVLKPAEADGRPVRLWKKARGAPVLEKTLGYNIWYYPESN TNLTETMNTTNQQLELHLGGESFWVSMISYNSLGKSPVATLRIPAIQEKSFCIEVMQA CVAEDQLVVWKWQSSALDVNTWMIEWFPDVSEPTTLSWESVSQATNWTIQQDKLKP FW CYNISVYPMLHDKVGEPSIQAYAKBGPSEG PETKVENIGVKTVTITWKEIPKSEF KGHCNYTIFYQAEGGKGFSKTVNSSLQYQLESLKRKTSYIVQVMASTSAGGTNGTSIN FKTLSFSVFEILITSLIGGGLLIILT VAYGLKKPNKLTHLCWPTVPNPAESSIATWHGD DFKDKLNLKESDDSVNTEDRILKPCSTPSDKLVIDKLVVNFGNVLQEIFTDEARTGQEN NLGGEKNGTRILSSCPTSI
15	Secuencia de aminoácidos de gp130 humana (SEQ ID NO:45)
20	MLTLQTWLVQALFIFTTESTGELLDPCGYISPEPSPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYF HVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFDIASLNQLTCNILTGFQLEQNVYGI THISGLPPEPKPNLSCIVNEGKKMRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKF DTPTSCTVDYDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKVTS DHINFDPVYKVKPNPPHNL SVINSE ELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTK DASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEY VFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWYKIDPSHTQGYRTVQLVWK TLPPFEANGKILDYEVTLTRWKS HLQNYTVNATKLT VNLNDRYLATLTVRNLVGKS DAAVLTIPACDFQATHPVM DLKAFPKDNMLWVEWTPRESVKKYILEWCVLSDKAP CITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPP SKGP TVRTKKVVGKNEA VLEWDQLPDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETAVNVDSSHTEYT LSS LTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGEFTFTPKFAQGEIEAIVV PVCL AFLTTLLGVLF CFNKRD LIKKHIWPVNVPDP SKSHIAQWSPHTPRHNFNSKDQMYSDSNFTDV SVEIV ANDKKPFPEDL KSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSI SSSDENESSQNTSSTV QYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHV DGGDGILPRQQYF KQNCSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQM KMFQE VSA ADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKSYLPQT VRQGGYMPQ
25	
30	
35	

40 Anticuerpos OSMR

**[0024]** Los anticuerpos para uso con la presente invención se unen específicamente a OSMR humano. Estos anticuerpos inhiben la unión de la OSM humana y la IL-31 humana a la OSMR humana y reducen la señalización mediada por la OSM humana y la IL-31 humana en células que expresan OSMR humana.

**[0025]** Los anticuerpos para uso con la invención se unen específicamente a OSMR humano. "Se une específicamente" como se usa en el presente documento significa que el anticuerpo se une preferentemente a OSMR sobre otras proteínas. "Se une específicamente" puede significar que el anticuerpo OSMR tiene una mayor afinidad por OSMR que por otras proteínas. Los anticuerpos OSMR que se unen específicamente a OSMR pueden tener una afinidad de unión por OSMR humano menor o igual a  $1 \times 10^{-7}$  M, menor o igual a  $2 \times 10^{-7}$  M, menor o igual a  $3 \times 10^{-7}$  M, menor o igual a  $4 \times 10^{-7}$  M, menor o igual a  $5 \times 10^{-7}$  M, menor o igual a  $6 \times 10^{-7}$  M, menor o igual a  $7 \times 10^{-7}$  M, menos menor o igual a  $8 \times 10^{-7}$  M, menor o igual a  $9 \times 10^{-7}$  M, menor o igual a  $1 \times 10^{-8}$  M, menor o igual a  $2 \times 10^{-8}$  M, menor o igual a  $3 \times 10^{-8}$  M, menor o igual a  $4 \times 10^{-8}$  M, menor o igual a  $5 \times 10^{-8}$  M, menor o igual a  $6 \times 10^{-8}$  M, menor o igual a  $7 \times 10^{-8}$  M, menor o igual a  $8 \times 10^{-8}$  M, menor o igual a  $9 \times 10^{-8}$  M, menor o igual a  $1 \times 10^{-9}$  M, menor o igual a  $2 \times 10^{-9}$  M, menor o igual a  $3 \times 10^{-9}$  M, menor o igual a  $4 \times 10^{-9}$  M, menor o igual a  $5 \times 10^{-9}$  M, menor o igual a  $6 \times 10^{-9}$  M, menor o igual a  $7 \times 10^{-9}$  M, menor o igual a  $8 \times 10^{-9}$  M, menor o igual a  $9 \times 10^{-9}$  M, menor o igual a  $1 \times 10^{-10}$  M, menor o igual a  $2 \times 10^{-10}$  M, menor o igual a  $3 \times 10^{-10}$  M, menor o igual a  $4 \times 10^{-10}$  M, menor o igual a  $5 \times 10^{-10}$  M, menos menor o igual a  $6 \times 10^{-10}$  M, menor o igual a  $7 \times 10^{-10}$  M, menor o igual a  $8 \times 10^{-10}$  M, menor o igual a  $9 \times 10^{-10}$  M, menor o igual a  $1 \times 10^{-11}$  M, menor o igual a  $2 \times 10^{-11}$  M, menor o igual a  $3 \times 10^{-11}$  M, menor o igual a  $4 \times 10^{-11}$  M, menor o igual a  $5 \times 10^{-11}$  M, menor o igual a  $6 \times 10^{-11}$  M, menor o igual a  $7 \times 10^{-11}$  M, menor o igual a  $8 \times 10^{-11}$  M, menor o igual a  $9 \times 10^{-11}$  M, menor o igual a  $1 \times 10^{-12}$  M, menor o igual a  $2 \times 10^{-12}$  M, menor o igual a  $3 \times 10^{-12}$  M, menor o igual a  $4 \times 10^{-12}$  M, menor o igual a  $5 \times 10^{-12}$  M, menor o igual a  $6 \times 10^{-12}$  M, menor o igual a  $7 \times 10^{-12}$  M, menor o igual a  $8 \times 10^{-12}$  M, o menor o igual a  $9 \times 10^{-12}$  M.

[0026] Los métodos para medir la afinidad de unión de un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Los métodos de uso común para la determinación de la afinidad incluyen Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) (Morton y Myszka "Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors" Methods in Enzymology (1998) 295, 268-294), BioLayer Interferometry, (Abdiche et al. "Determining Kinetics and Affinities of

5 Protein Interactions Using a Parallel Realtime Label-free Biosensor, the Octet" Analytical Biochemistry (2008) 377, 209-217), ensayo de exclusión cinética (KinExA) (Darling y Brault "Kinetic exclusion assay technology: characterization of molecular interactions" Assay and Drug Dev Tech (2004) 2, 647-657), calorimetría isotérmica (Pierce et al 10 "Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions" Methods (1999) 19, 213-221) y ultracentrifugación analítica (Lebowitz et al "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review" Protein Science (2002), 11:2067-2079). El Ejemplo 5 proporciona métodos ejemplares de determinación de la afinidad.

[0027] Se entiende que cuando en el presente documento se hace referencia a "anticuerpos de unión a OSMR", esto también abarca fragmentos de unión a OSMR de dichos anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente a OSMR. Los anticuerpos OSMR para uso con la invención inhiben la unión de OSM humana y IL-31 humana a OSMR humana y reducen la señalización mediada por OSM humana y IL-31 humana en células que expresan OSMR humana. Se dice que estos anticuerpos son "neutralizantes". En ciertos aspectos, el anticuerpo OSMR neutralizante se une específicamente a OSMR e inhibe la unión de OSM humana y de IL-31 humana a OSMR humana desde cualquier lugar entre 10 % y 100 %, tal como por al menos aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % o más. Por ejemplo, los anticuerpos OSMR pueden ensayarse para determinar su capacidad neutralizante determinando la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión de OSM humana e IL-31 humana a OSMR humana, véase, por ejemplo, el ensayo de bloqueo de OSMR humano del Ejemplo 2. Alternativamente, los anticuerpos OSMR se puede probar para determinar la capacidad neutralizante en un ensayo que mide el efecto de la presencia del anticuerpo OSMR en un ensayo que mide la función biológica mediada por OSM humana y IL-31 humana. Por ejemplo, la capacidad de la OSM humana para inducir una respuesta biológica, tal como la estimulación de la actividad activadora del plasminógeno en células endoteliales aórticas bovinas cultivadas, la regulación de la expresión de IL-6 en células endoteliales humanas y la estimulación de la captación de LDL y la regulación positiva de los receptores de LDL de superficie celular en las células HepG2. Alternativamente, la capacidad de la IL-31 humana para inducir inflamación en la piel.

[0028] En algunos aspectos, el anticuerpo para usar con la invención comprende un dominio variable de cadena ligera que consiste en el dominio variable de cadena ligera (LCv) de Ab2 (SEQ ID NO: 28) y/o un dominio variable de cadena pesada que consiste en el dominio variable de cadena pesada de Ab2. (VHC), (SEQ ID NO:10).

[0029] Una variante de dominio variable de cadena pesada ejemplar de SEQ ID NO:10 contiene un aminoácido distinto de asparagina (p. ej., ácido aspártico) en la posición correspondiente a la posición 73 en SEQ ID NO:10. La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10 NO:54 es un ejemplo de una variante de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:10.

[0030] Una cadena ligera ejemplar que comprende Ab2 LCv es una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:25.

[0031] Una cadena pesada ejemplar que comprende Ab2 HCv es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:7. Una cadena pesada ejemplar que comprende una variante de Ab2 HCv es una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:51.

[0032] Un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender los dominios variables Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:10). También se incluye un anticuerpo que comprende los dominios variables SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:54.

[0033] Un anticuerpo ejemplar descrito en el presente documento incluye Ab2 (SEQ ID NO:25/SEQ ID NO:7). Un anticuerpo ejemplar adicional incluye SEQ ID NO:25/SEQ ID NO:51.

[0034] El anticuerpo OSMR para usar con la invención comprende las CDR de Ab2 LCv: LCDR1 (SEQ ID NO:31), LCDR2 (SEQ ID NO:34) y LCDR3 (SEQ ID NO:37); y las CDR de Ab2 HCv: HCDR1 (SEQ ID NO:13), HCDR2 (SEQ ID NO:16) y HCDR3 (SEQ ID NO:19).

[0035] El anticuerpo OSMR para uso con la invención comprende: A) un polipéptido para una cadena ligera, que comprende un LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31; un LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; y un LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:37; y B) un polipéptido para una cadena pesada, que comprende un HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13; un HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16; y un HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19.

[0036] El anticuerpo OSMR para usar con la invención comprende A) una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de Ab2 LCv y B) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende HCDR1, HCDR2, y HCDR3 de Ab2 HCv.

5 [0037] Un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender un dominio variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 28. Un anticuerpo descrito en este documento puede comprender un dominio variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 10. Un anticuerpo descrito en este documento puede comprender A) una variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 10, dominio que consiste en SEQ ID NO: 28, y B) un dominio variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 10.

10 [0038] Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden comprender cualquier región constante conocida en la técnica. La región constante de cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipo alfa, delta, 15 epsilon, gamma o mu, por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana alfa, delta, epsilon, gamma o Región constante de cadena pesada tipo mu. En una forma de realización, la región constante de cadena ligera o pesada es un fragmento, derivado, variante o muteína de una región constante de origen natural.

20 [0039] Un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 28 que tiene no más de uno, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. Un anticuerpo descrito en el presente documento puede comprender una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 10 que tiene no más de uno, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. Un anticuerpo descrito en el presente documento puede 25 comprender A) que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 28 que tiene no más de uno, no más de dos, no más de tres, no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve o no más de diez adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos, y B) una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 10 que tiene no más de una, no más de dos, no más de tres, 30 no más de cuatro, no más de cinco, no más de seis, no más de siete, no más de ocho, no más de nueve o no más de diez adiciones de aminoácidos, eliminaciones o sustituciones.

35 [0040] En una variación, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 28. En otra variación, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, 40 al menos al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 10. En aún un aspecto adicional, el anticuerpo comprende A) una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, 45 al menos al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 10. Un anticuerpo OSMR que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la relación de secuencia definida anteriormente con SEQ ID NO: 10 puede contener opcionalmente una aminoácido distinto de asparagina (p. ej., ácido 50 aspártico) en la posición correspondiente a la posición 73 en SEQ ID NO: 10. En tales formas de realización, el dominio variable de cadena pesada comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54.

55 [0041] El anticuerpo descrito en el presente documento comprende los armazones de anticuerpos tradicionales, incluidos anticuerpos humanos y monoclonales, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en el presente documento "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos químicos, fusiones de anticuerpos (a veces denominados en este documento "miméticos de anticuerpos") como "conjugados de anticuerpos", y fragmentos de cada uno, respectivamente. Las CDR descritas anteriormente se pueden injertar en cualquiera de los siguientes armazones.

60 [0042] Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a las diversas formas de proteínas monoméricas o multiméricas que comprenden una o más cadenas polipeptídicas que se unen específicamente a un antígeno, como se describe de diversas formas en el presente documento. En ciertos aspectos, los anticuerpos se producen mediante técnicas de ADN recombinante. En aspectos adicionales, los anticuerpos se producen mediante 65

escisión enzimática o química de anticuerpos naturales. En otro aspecto, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: a) un anticuerpo humano; b) un anticuerpo humanizado; c) un anticuerpo químérico; d) un anticuerpo monoclonal; e) un anticuerpo polyclonal; f) un anticuerpo recombinante; g) un fragmento de unión a antígeno; h) un anticuerpo de cadena sencilla; i) un diacuerpo; j) un triacuerpo, k) un tetracuerpo, l) un fragmento Fab; m) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>; n) un anticuerpo IgA, o) un anticuerpo IgD, p) un anticuerpo IgE, q) un anticuerpo IgG1, r) un anticuerpo IgG2, s) un anticuerpo IgG3, t) un anticuerpo IgG4, y u) un anticuerpo IgM.

**[0043]** Una región o dominio variable comprende al menos tres CDR de cadena pesada o ligera incrustadas dentro de una región marco (regiones marco designadas FR1, FR2, FR3 y FR4). Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD. Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales normalmente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero suele estar compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" y otra "pesada". La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon y definen el isotpico del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases, que incluyen, entre otras, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases que incluyen, entre otras, IgM1 e IgM2. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden incluir todas las clases y subclases de anticuerpos que incorporan un dominio variable o CDR del anticuerpo según se reivindica.

**[0044]** Algunos anticuerpos naturales, como los que se encuentran en camellos y llamas, son dímeros que constan de dos cadenas pesadas y no incluyen cadenas ligeras. Los anticuerpos descritos en el presente documento abarcan anticuerpos diméricos de dos cadenas pesadas, o fragmentos de las mismas, que pueden unirse a OSMR.

**[0045]** Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera típicamente exhiben la misma estructura general de regiones estructurales (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, es decir, las regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR son las principales responsables del reconocimiento y la unión de antígenos. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones estructurales, lo que permite la unión a un epítopo específico. Desde el terminal N al terminal C, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio está de acuerdo con las definiciones de Kabat.

**[0046]** Las CDR constituyen los principales puntos de contacto de superficie para la unión de antígenos. La CDR3 o la cadena ligera y, particularmente, la CDR3 de la cadena pesada pueden constituir los determinantes más importantes en la unión del antígeno dentro de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada. En algunos anticuerpos, la cadena pesada CDR3 parece constituir la principal área de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Se pueden usar esquemas de selección in vitro en los que se varía CDR3 sola para variar las propiedades de unión de un anticuerpo o determinar qué residuos contribuyen a la unión de un antígeno.

**[0047]** Los anticuerpos naturales normalmente incluyen una secuencia señal, que dirige el anticuerpo hacia la vía celular para la secreción de proteínas y que normalmente no está presente en el anticuerpo maduro. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo para su uso con la invención puede codificar una secuencia señal de origen natural o una secuencia señal heteróloga como se describe a continuación.

**[0048]** Un anticuerpo descrito en el presente documento puede ser de cualquier tipo, incluidos anticuerpos IgM, IgG (incluidos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgD, IgA o IgE. En una forma de realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo de tipo IgG, por ejemplo, un anticuerpo IgG1.

**[0049]** Aspectos específicos utilizan componentes de armazón de los anticuerpos que son componentes humanos. En algunos aspectos, sin embargo, los componentes del armazón pueden ser una mezcla de diferentes especies. Como tal, el anticuerpo puede ser un anticuerpo químérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto "anticuerpos químéricos" como "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos químéricos" tradicionalmente comprenden regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y la(s) región(es) constante(s) de un ser humano.

**[0050]** Los "anticuerpos humanizados" generalmente se refieren a anticuerpos no humanos a los que se les han intercambiado las regiones estructurales del dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto una o más CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de una o más CDR. Las CDR, algunas o todas ellas codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en la estructura de la hoja beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, por ejemplo, en WO 92/11018, Jones 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536. También se pueden generar anticuerpos humanizados utilizando ratones con un sistema inmunológico modificado genéticamente (Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654). En las formas de realización ejemplares descritas en el presente

documento, las CDR identificadas son humanas y, por lo tanto, tanto los anticuerpos humanizados como los químéricos en este contexto incluyen algunas CDR no humanas; por ejemplo, se pueden generar anticuerpos humanizados que comprendan las regiones HCDR3 y LCDR3, siendo una o más de las otras regiones CDR de un origen de especie diferente.

5 [0051] En un aspecto, el anticuerpo OSMR es un anticuerpo multiespecífico y, en particular, un anticuerpo biespecífico, también denominado a veces "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos o más antígenos diferentes o epítopos diferentes en un solo antígeno. En determinadas formas de realización, un anticuerpo biespecífico se une a OSMR y un antígeno en una célula efectora humana (p. ej., célula T). Dichos anticuerpos son útiles para dirigir una respuesta de células efectoras contra células que expresan OSMR, tales como una célula tumoral que expresa OSMR. En aspectos preferidos, el antígeno de la célula efectora humana es CD3. Patente de EE. UU. Nº 7.235.641. En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Uno de dichos métodos implica diseñar la porción Fc de las cadenas pesadas para crear "perillas" y "agujeros" que faciliten la formación de heterodímeros de las cadenas pesadas cuando se coexpresan en una célula. US 7.695.963. Otro método también implica diseñar la porción Fc de la cadena pesada, pero utiliza dirección electrostática para estimular la formación de heterodímeros y al mismo tiempo desalentar la formación de homodímeros de las cadenas pesadas cuando se coexpresan en una célula. WO 09/089.004.

10 20 [0052] En un aspecto, el anticuerpo OSMR es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpos minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu et al., 1996, Cancer Res. 56:3055-3061).

25 [0053] En un aspecto, el anticuerpo OSMR es un anticuerpo de dominio; véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. número 6.248.516. Anticuerpos de Dominio (dAb) son dominios de unión funcionales de anticuerpos, correspondientes a las regiones variables de las cadenas pesada ( $V_H$ ) o ligera ( $V_L$ ) de los anticuerpos humanos. Los dAb tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa, o menos de una décima parte del tamaño de un anticuerpo completo. Los dAb se expresan bien en una variedad de huéspedes, incluidos sistemas de células bacterianas, de levaduras y de mamíferos. Además, los dAb son muy estables y conservan su actividad incluso después de haber sido sometidos a condiciones duras, como la liofilización o la desnaturalización por calor. Véanse, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; número de serie de EE. UU. 2004/0110941; Patente Europea 0368684; 30 Patente de EE. UU. 6.696.245, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609.

35 [0054] En una forma de realización, el anticuerpo de unión a OSMR para usar con la invención es un fragmento de un anticuerpo que conserva la especificidad de unión a OSMR. En diversos aspectos, dichos fragmentos comprenden, entre otros, fragmentos F(ab), F(ab'), F(ab')2, Fv o Fv de cadena sencilla. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos de unión a OSMR incluyen, entre otros, (i) el fragmento Fab que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546) que consta de una única variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos mediante un 40 conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:5879-5883), (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos" o "tricuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica (Tomlinson et. al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90:6444-6448). Los fragmentos de anticuerpos 45 pueden modificarse. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245). Los componentes no CDR de estos fragmentos pueden ser secuencias humanas.

50 [0055] En una forma de realización, el anticuerpo OSMR es un anticuerpo completamente humano. En esta forma de realización, como se describió anteriormente, las estructuras específicas comprenden cadenas pesadas y ligeras completas representadas que comprenden las regiones CDR. Aspectos adicionales utilizan una o más de las CDR para su uso con la invención, proviniendo las otras CDR, regiones estructurales, regiones J y D, regiones constantes, etc., de otros anticuerpos humanos. Por ejemplo, las CDR para uso con la invención pueden reemplazar las CDR de cualquier número de anticuerpos humanos, particularmente anticuerpos comercialmente relevantes.

55 [0056] Los anticuerpos de cadena sencilla se pueden formar uniendo fragmentos de dominio variable de cadena pesada y ligera (región Fv) a través de un puente de aminoácidos (enlazador peptídico corto), lo que da como resultado una única cadena polipeptídica. Dichos Fv monocatenarios (scFv) se han preparado fusionando ADN que codifica un conector peptídico entre ADN que codifican los dos polipéptidos de dominio variable ( $V_L$  y  $V_H$ ). Los polipéptidos resultantes pueden plegarse sobre sí mismos para formar monómeros de unión a antígeno, o pueden formar multímeros (p. ej., dímeros, trímeros o tetrámeros), dependiendo de la longitud de un conector flexible entre los dos dominios variables (Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108). Combinando diferentes polipéptidos que comprenden  $V_L$  y  $V_H$ , se pueden formar scFv multiméricos que se unen a diferentes epítopos (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40). Las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla incluyen las descritas en la Patente de EE. UU. Nº 4.946.778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston y col., 1988, Proc. Nacional. Acad. Science. EE. UU. 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002,

Methods Mol Biol. 178:379-87. En el presente documento se describen anticuerpos de cadena sencilla derivados de anticuerpos proporcionados en el presente documento (incluidos, entre otros, scFv que comprenden la combinación de dominio variable de Ab2 LCv/Ab2 HCv (SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:10). Un anticuerpo de cadena simple ejemplar incluye la combinación de dominio variable: SEQ ID NO:28/SEQ ID NO:54.

5 [0057] En un aspecto, el anticuerpo OSMR es una proteína de fusión de anticuerpos (a veces denominada en el presente documento "conjugado de anticuerpo"). El compañero conjugado puede ser proteico o no proteico; este último generalmente se genera usando grupos funcionales en el anticuerpo y en el compañero conjugado. En ciertos aspectos, el anticuerpo se conjuga con una sustancia química no proteica (fármaco) para formar un conjugado de anticuerpo-fármaco.

10 [0058] Por "proteína", como se usa en el presente documento, se entiende al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, lo que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. En algunas formas de realización, los dos o más aminoácidos unidos covalentemente están unidos mediante un enlace peptídico. La proteína puede estar formada por aminoácidos y enlaces peptídicos naturales, por ejemplo, cuando la proteína se produce de forma recombinante usando sistemas de expresión y células huésped, como se describe a continuación. Alternativamente, la proteína puede incluir aminoácidos sintéticos (p. ej., homofenilalanina, citrulina, ornitina y norleucina), o estructuras peptidomiméticas, es decir, "análogos de péptidos o proteínas", tales como peptoides (véase Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89:9367), que puede ser resistente a proteasas u otras condiciones fisiológicas y/o de almacenamiento. Dichos aminoácidos sintéticos pueden incorporarse en particular cuando el anticuerpo se sintetiza *in vitro* mediante métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Además, se puede utilizar cualquier combinación de residuos/estructuras peptidomiméticos, sintéticos y de origen natural. "Aminoácido" también incluye residuos de iminoácido tales como prolina e hidroxiprolina. El aminoácido "grupo R" o "cadena lateral" puede estar en la configuración (L) o (S). En una forma de realización específica, los aminoácidos están en la configuración (L) o (S).

15 [0059] En determinadas formas de realización, el anticuerpo para usar con la invención es un anticuerpo recombinante que se une a OSMR. En este contexto, una "proteína recombinante" es una proteína elaborada usando técnicas recombinantes usando cualquier técnica y método conocido en la técnica, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante como se describe en el presente documento. Métodos y técnicas para la producción 20 de proteínas recombinantes son bien conocidas en la técnica.

25 [0060] "Consta esencialmente de" significa que la secuencia de aminoácidos puede variar en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 % con respecto a la citada secuencia SEQ ID NO: y aún conservar actividad 30 biológica, como se describe en el presente documento.

35 [0061] En algunas formas de realización, los anticuerpos para usar con la invención son proteínas aisladas o proteínas sustancialmente puras. Una proteína "aislada" no está acompañada por al menos parte del material con el que normalmente está asociada en su estado natural, constituyendo por ejemplo al menos aproximadamente el 5 %, o al menos aproximadamente el 50 % en peso de la proteína total en una muestra dada. Se entiende que la proteína 40 aislada puede constituir del 5 al 99,9 % en peso del contenido proteico total dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la proteína se puede preparar en una concentración significativamente mayor mediante el uso de un promotor inducible o un promotor de alta expresión, de manera que la proteína se produce en niveles de concentración aumentados. La definición incluye la producción de un anticuerpo en una amplia variedad de organismos y/o células huésped que se conocen en la técnica.

45 [0062] Para secuencias de aminoácidos, la identidad y/o similitud de secuencia se determina usando técnicas estándar conocidas en la técnica, incluido, entre otros, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. 50 Science. EE. UU. 85:2444, implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin), el programa de secuencia Best Fit descrito por Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, preferiblemente usando la configuración predeterminada o mediante inspección. Preferiblemente, FastDB calcula el porcentaje de identidad basándose en los siguientes parámetros: penalización por falta de coincidencia de 1; penalización por brecha de 1; penalización por tamaño de brecha de 0,33; y penalización de unión de 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, págs. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

60 [0063] Un ejemplo de algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiples a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas por pares. También puede trazar un árbol que muestre las relaciones de agrupamiento utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método de alineación progresiva de Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evolución. 35:351-360; el método es similar al descrito por Higgins y Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Parámetros PILEUP útiles que incluyen un peso de espacio predeterminado de 3,00, un peso de longitud de espacio predeterminado de 0,10 y espacios finales ponderados.

5 [0064] Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito en: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; y Karin et al., 1993, Proc. Nacional. Acad. Science. EE. UU. 90:5873-5787. Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que se obtuvo de Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la

10 mayoría de los cuales están configurados con los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: intervalo de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = II. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y los establece el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de la base de datos particular contra la cual se busca la secuencia de interés; sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad.

15 [0065] Un algoritmo útil adicional es el BLAST con huecos, como informa Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. Gapped BLAST utiliza puntuaciones de sustitución BLOSUM-62; parámetro umbral T establecido en 9; el método de dos golpes para activar extensiones sin espacios, cobra longitudes de espacios de k a y un costo de 10+k;  $X_u$  se establece en 16 y  $X_g$  se establece en 40 para la etapa de búsqueda de la base de datos y en 67 para la etapa de salida de los algoritmos. Las alineaciones con espacios se activan mediante una puntuación correspondiente a aproximadamente 22 bits.

20 [0066] Generalmente, el "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a la secuencia de ácido nucleico de las proteínas de unión identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de nucleótidos en la secuencia codificante de la Proteína de unión a antígeno. Un método específico utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 configurado con los parámetros predeterminados, con el intervalo de superposición y la fracción de superposición establecidos en 1 y 0,125, respectivamente.

25 [0067] Si bien el sitio o región para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la mutación *per se* esté predeterminada. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio determinado, se puede realizar una mutagénesis aleatoria en el codón o región objetivo y seleccionar la proteína de unión al antígeno expresada para determinar la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados del ADN que tienen una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis con cebador M13 y mutagénesis por PCR. La detección de los mutantes se realiza mediante ensayos de las actividades de las proteínas de unión a antígeno, tales como la unión a OSMR.

30 [0068] Las sustituciones de aminoácidos suelen ser de residuos únicos; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácidos, aunque se pueden tolerar inserciones considerablemente mayores. Las delecciones varían de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácidos, aunque en algunos casos las delecciones pueden ser mucho mayores.

35 [0069] Se pueden utilizar sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para llegar a un derivado o variante final. Generalmente estos cambios se realizan en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, particularmente la inmunogenicidad y especificidad del anticuerpo. Sin embargo, en determinadas circunstancias se pueden tolerar cambios mayores. Las sustituciones conservadoras generalmente se realizan de acuerdo con el siguiente cuadro representado en la Tabla 2.

45

50

55

60

65

Tabla 2

	Residuo original	Sustituciones ejemplares
5	Ala	Ser
	Arg	Lis
	Asn	Gln, His
10	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
15	Gly	Pro
	His	Asn, Gln
	Ile	Leu, Val
	Leu	Ile, Val
20	Lys	Arg, Gln, Glu
	Met	Leu, Ile
	Phe	Met, Leu, Tyr
	Ser	Thr
25	Thr	Ser
	Trp	Tyr
	Tyr	Trp, Phe
	Val	Ile, Leu

30 [0070] Se realizan cambios sustanciales en la función o la identidad inmunológica seleccionando sustituciones que son menos conservadoras que las que se muestran en la Tabla 2. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones que afecten más significativamente: la estructura de la estructura polipeptídica en el área de la alteración, por ejemplo, la estructura de hélice alfa o de lámina beta; la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo; o la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades del polipéptido son aquellas en las que (a) un residuo hidrofílico, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por un residuo hidrofóbico, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) se sustituye por cualquier otro residuo una cisteína o prolina; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, está sustituido por un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina.

45 [0071] Las variantes normalmente exhiben la misma actividad biológica cualitativa y provocarán la misma respuesta inmune que el análogo natural, aunque también se seleccionan variantes para modificar las características de las 50 proteínas del anticuerpo según sea necesario. Alternativamente, la variante puede diseñarse de manera que se altere la actividad biológica del anticuerpo. Por ejemplo, los sitios de glicosilación pueden alterarse o eliminarse como se analiza en el presente documento.

55 [0072] Un anticuerpo OSMR descrito en el presente documento puede incluir conjugados covalentes o agregativos de anticuerpos OSMR, o fragmentos de los mismos, con otras proteínas o polipéptidos, tales como mediante expresión de proteínas de fusión recombinantes que comprenden polipéptidos heterólogos fusionados al extremo N o C de un polipéptido de anticuerpo OSMR. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser un polipéptido señal (o líder) heterólogo, como se describe en Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988, y la Patente de EE. UU. 5.011.912. El péptido FLAG es altamente antigenico y proporciona un epítopo unido de manera reversible por un anticuerpo monoclonal específico (mAb), lo que permite un ensayo rápido y una purificación sencilla de la proteína recombinante expresada. Los reactivos útiles para preparar proteínas de fusión en las que el péptido FLAG está fusionado a un polipéptido determinado están disponibles comercialmente (Sigma, St. Louis, MO).

60 [0073] Se puede preparar un oligómero utilizando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (incluido el dominio Fc) ha sido descrita, por ejemplo, por Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535; Byrn y col., 1990, Nature 344:677; y Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, págs. 10.19.1 - 10.19.11.

5 [0074] Se puede preparar un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas fusionando un fragmento de unión a OSMR de un anticuerpo OSMR con la región Fc de un anticuerpo. El dímero se puede preparar, por ejemplo, insertando una fusión genética que codifica la proteína de fusión en un vector de expresión apropiado, expresando la fusión genética en células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante, y permitir que la proteína de fusión expresada se ensamble de manera muy similar a las moléculas de anticuerpo, tras lo cual se forman enlaces disulfuro entre cadenas entre los restos Fc para producir el dímero.

10 [0075] El término "polipéptido Fc" como se usa en el presente documento incluye formas nativas y muteínas de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. También se incluyen formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Las proteínas de fusión que comprenden restos Fc (y los oligómeros formados a partir de ellas) ofrecen la ventaja de una fácil purificación mediante cromatografía de afinidad sobre las columnas de Proteína A o Proteína G.

15 [0076] Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido de cadena sencilla que se extiende desde la región bisagra N-terminal hasta el extremo C nativo de la región Fc de un anticuerpo IgG humano. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente de EE. UU. 5.457.035 y en Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia de Fc nativa presentada en el documento WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 se ha cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 se ha cambiado de Leu a Glu y el aminoácido 22 se ha cambiado de Gly a Ala. La muteína muestra una afinidad reducida por los receptores Fc.

20 [0077] La porción variable de las cadenas pesada y/o ligera de un anticuerpo OSMR puede sustituirse por la porción variable de una cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo.

25 [0078] Otro método para preparar derivados de anticuerpos OSMR oligoméricos implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión al ADN (Landschulz et al., Science 240:1759-64, 1988) y desde entonces se han encontrado en una variedad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran los péptidos naturales y sus derivados que se dimerizan o trimerizan. Ejemplos de dominios de cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína D tensioactiva pulmonar (SPD) descrita en Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a la misma se describe en Fanslow et al., 1994, Semin. Inmunol. 6:267-78. En un enfoque, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden un fragmento o derivado de anticuerpo OSMR fusionado a un péptido de cremallera de leucina se expresan en células huésped adecuadas, y los fragmentos o derivados de anticuerpo OSMR oligoméricos solubles que se forman se recuperan del sobrenadante del cultivo.

40 [0079] Las modificaciones covalentes de anticuerpos se describen en el presente documento y generalmente, aunque no siempre, se realizan de forma postraduccional. Por ejemplo, se introducen en la molécula varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos terminales N o C.

45 [0080] Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar más comúnmente con  $\alpha$ -haloacetatos (y aminas correspondientes), como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxamidometilo. Los residuos de cisteinilo también se derivan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-imidozoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de 2-piridilo de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

50 [0081] Los residuos de histidilo se derivan mediante reacción con pirocarbonato de dietilo a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. También es útil el bromuro de parabromofenacilo; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

55 [0082] Los residuos lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasas con glicoxilato.

60 [0083] Los residuos de arginilo se modifican mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto  $pK_a$  del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo  $\epsilon$ -amino de arginina.

5 [0084] Se puede realizar la modificación específica de residuos de tirosilo, con particular interés en introducir marcadores espectrales en residuos de tirosilo mediante la reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranirometano. Más comúnmente, se utilizan N-acetilimidizol y tetranirometano para formar especies de O-acetiltirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos de tirosilo se yodan usando  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de cloramina T descrito anteriormente.

10 [0085] Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas ( $\text{R}'-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}''$ ), donde  $\text{R}$  y  $\text{R}''$  son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etyl)carbodiimida o 1-etyl-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

15 [0086] La derivatización con agentes bifuncionales es útil para entrecruzar anticuerpos con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su uso en una variedad de métodos. Los agentes reticulantes comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluidos ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes como el 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo producen intermedios fotoactivables que son capaces de formar enlaces cruzados en presencia de luz. Alternativamente, se pueden utilizar matrices reactivas insolubles en agua tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE. UU. N°s 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 se emplean para la inmovilización de proteínas.

20 [0087] Los residuos de glutaminilo y asparaginilo frecuentemente se desamidan a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desamidan en condiciones ligeramente ácidas. Cualquiera de las formas de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención.

25 [0088] Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, págs. 79-86), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

30 [0089] Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo descrito en el presente documento comprende alterar el 35 patrón de glicosilación de la proteína. Como se sabe en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (p. ej., la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glicosilación particulares, discutidos más adelante) como de la célula huésped u organismo en el que se produce la proteína. A continuación, se analizan sistemas de expresión particulares.

40 [0090] La glicosilación de polipéptidos suele estar unida a N o a O. Unido a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación unida a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más 45 comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

50 [0091] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición o sustitución por uno o más 55 residuos de serina o treonina a la secuencia inicial (para sitios de glicosilación unidos a O). Para facilitar, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se altera preferiblemente mediante cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas de modo que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

60 [0092] Otro medio de aumentar el número de restos de carbohidratos en el anticuerpo es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula huésped que tenga capacidades de glicosilación para la glicosilación unida a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306.

65 [0093] La eliminación de restos de carbohidratos presentes en el anticuerpo inicial se puede lograr química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o

de todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el polipéptido intacto. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de restos de carbohidratos en polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo y exoglicosidasas como describen Thotakura et al., 1987, Meth. Enzimol. 138:350. La glicosilación en sitios potenciales de glicosilación puede prevenirse mediante el uso del compuesto tunicamicina como describen Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glucósido.

5 [0094] Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a diversos polímeros no proteicos, incluidos, entre otros, diversos polioles tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera establecida en la Patente de EE. UU. N°s 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 10 4.179.337. Además, como se sabe en la técnica, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro del anticuerpo para facilitar la adición de polímeros tales como PEG.

15 [0095] En algunos aspectos, la modificación covalente de los anticuerpos para su uso con la invención comprende la adición de uno o más marcadores.

20 [0096] El término "grupo de etiquetado" significa cualquier etiqueta detectable. Ejemplos de grupos marcadores adecuados incluyen, entre otros, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej.,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), grupos fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), grupos enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotinilo o 25 epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos). En algunos aspectos, el grupo marcador se acopla al anticuerpo mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. En la técnica se conocen varios métodos para marcar 30 proteínas.

35 [0097] En general, los marcadores se clasifican en diversas clases, según el ensayo en el que se van a detectar: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) etiquetas magnéticas (p. ej., partículas magnéticas); c) restos activos redox; d) tintes ópticos; grupos enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopos, etc.). En algunas formas de realización, el grupo marcador se acopla al anticuerpo mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible 40 impedimento estérico. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas.

45 [0098] Los marcadores específicos incluyen colorantes ópticos, incluidos, entre otros, cromóforos, fósforos y fluoróforos, siendo estos últimos específicos en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser fluores de "molécula pequeña" o fluores proteicos.

50 [0099] Por "etiqueta fluorescente" se entiende cualquier molécula que pueda detectarse mediante sus propiedades fluorescentes inherentes. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, entre otros, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malacita, estilbeno, amarillo Lucifer, azul Cascade J, rojo Texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green, los tintes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamina y Texas Red (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Los colorantes ópticos adecuados, incluidos los fluoróforos, se describen en Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

55 [0100] Marcadores fluorescentes proteicos adecuados también incluyen, pero no se limitan a proteína fluorescente verde, incluyendo especies Renilla, Ptilosarcus o Aequorea de GFP (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., número de acceso de Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stuber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteína fluorescente amarilla mejorada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferasa (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417),  $\beta$  galactosidasa (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 85:2603-2607) y Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Patente de EE. UU. N°s 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 60 5874304, 5876995, 5925558).

65 [0101] Los anticuerpos ejemplares descritos en el presente documento tienen propiedades basadas en el epítopo distinto en OSMR unido por el anticuerpo. El término "epítopo" significa los aminoácidos de una molécula diana que entran en contacto con un anticuerpo, cuando el anticuerpo está unido a la molécula diana. Un epítopo puede ser contiguo o no contiguo (p. ej., (i) en un polipéptido monocatenario, residuos de aminoácidos que no son contiguos entre sí en la secuencia del polipéptido pero que dentro del contexto de la molécula diana están unidos por el

anticuerpo, o (ii) en un receptor multimérico que comprende dos o más componentes individuales, por ejemplo, OSMR y gp130 o OSMR y receptor A de IL-31, los residuos de aminoácidos están presentes en uno o más de los componentes individuales pero todavía están unidos por el anticuerpo. Los determinantes de epítopos pueden incluir agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o sulfonilo, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Generalmente, anticuerpos específicos para una molécula objetivo particular reconocerán preferentemente un epítopo en la molécula diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

**[0102]** Los métodos para caracterizar el epítopo unido por un anticuerpo son bien conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, binning (competencia cruzada) (Miller et al "Epitope binning of murine monoclonal anticuerpos by a multiplexed pairing assay" J Immunol Methods (2011) 365, 118-25), mapeo de péptidos (p. ej., PEPSPOT™) (Albert et al "The B-cell Epitope of the Monoclonal Anti-Factor VIII Antibody ESH8 Characterised by Peptide Array Analysis" 2008 Thromb. Haemost. 99, 634 -7), métodos de mutagénesis como quimeras (Song et al "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized AntiCD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" J. Virol. (2010) 84, 6935-6942), exploración de alanina (Cunningham y Wells "High-resolution epitope mapping of HGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis" Science (1989) 244, 1081-1085), exploración de arginina (Lim et al "A diversity of antibody epitopes can induce signaling through the erythropoietin receptor" Biochemistry (2010) 49, 3797-3804), métodos de intercambio HD (Coates et al "Epitope mapping by amide hydrogen/deuterium exchange coupled with immobilization of antibody, on-line proteolysis, liquid chromatography and mass spectrometry" Rapid Commun. Mass Spectrom. (2009) 23 639-647), métodos de saturación cruzada de RMN > Morgan et al "Precise epitope mapping of malaria parasite inhibitory antibodies by TROSY NMR crosssaturation" Biochemistry (2005) 44, 518-23), y cristalográfica (Gerhardt et al "Structure of IL-17A in complex with a potent, fully human neutralizing antibody" J. Mol. Biol (2009) 394, 905-21). Los métodos varían en el nivel de detalle que proporcionan en cuanto a los aminoácidos que comprenden el epítopo. El ejemplo 4 proporciona un método ejemplar de agrupación de epítopos.

**[0103]** En ciertas formas de realización, el OSMR descrito en el presente documento tiene un epítopo idéntico al Ab2 y comprende a) un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID. N°: 28; b) un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10; o c) el dominio variable de cadena ligera de a) y el dominio variable de cadena pesada de b).

**[0104]** En ciertos aspectos, el anticuerpo OSMR tiene un epítopo idéntico al Ab2 y comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:28 y un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos el 90 %, al menos el 95 %, o es idéntico a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:10.

**[0105]** En ciertos aspectos, el anticuerpo OSMR tiene un epítopo idéntico al Ab2, y comprende a) un dominio variable de cadena ligera que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID. N°: 28; b) un dominio variable de cadena pesada que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10; o c) el dominio variable de cadena ligera de a) y el dominio variable de cadena pesada de b).

**[0106]** En ciertos aspectos, el anticuerpo OSMR tiene un epítopo idéntico al Ab2 y comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 28 y un dominio variable de cadena pesada que tiene no más de diez o no más de cinco adiciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:10.

Una variante de dominio variable de cadena pesada ejemplar de SEQ ID NO:10 contiene un aminoácido distinto de asparagina (p. ej., ácido aspártico) en la posición correspondiente a la posición 73 en SEQ ID NO:10. La secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:54 es un ejemplo de una variante de dominio variable de cadena pesada de SEQ ID NO:10.

**[0107]** En ciertas formas de realización, el anticuerpo OSMR para usar con la invención tiene un epítopo idéntico al Ab2 y comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia LCDR1 expuesta en SEQ ID NO:31; una secuencia LCDR2 expuesta en SEQ ID NO:34; y una secuencia LCDR3 expuesta en SEQ ID NO:37; y un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13; una secuencia HCDR2 expuesta en SEQ ID NO: 16; y una secuencia HCDR3 expuesta en SEQ ID NO: 19.

El anticuerpo OSMR descrito en el presente documento puede contener opcionalmente un dominio variable de cadena pesada que comprende un aminoácido distinto de asparagina (p. ej., ácido aspártico) en la posición correspondiente a la posición 73 en SEQ ID NO: 10. En tales formas de realización, el dominio variable de cadena pesada comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 54.

**[0108]** Los anticuerpos que tienen un epítopo idéntico o un epítopo superpuesto compiten de forma cruzada por unirse al antígeno. Un anticuerpo para uso con la invención tiene competencia cruzada con Ab2. "Competir de manera

cruzada" o "competencia cruzada" significa que los anticuerpos compiten por el mismo epítopo o sitio de unión en un objetivo. Dicha competencia puede determinarse mediante un ensayo en el que el anticuerpo de referencia previene o inhibe la unión específica de un anticuerpo de prueba, y viceversa. Se pueden utilizar numerosos tipos de ensayos de unión competitiva para determinar si una molécula de prueba compite con una molécula de referencia por la unión. 5 Ejemplos de ensayos que pueden emplearse incluyen radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA, por sus siglas en inglés), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA, por sus siglas en inglés), ensayo de competición en sándwich (véase, por ejemplo, Stahli et al. (1983) *Methods in Enzymology* 9:242 -253), EIA de biotina-avidina directa en fase sólida (véase, por ejemplo, Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-9), ensayo de marcado directo en fase sólida, ensayo tipo sándwich de marcado directo en fase sólida, Luminex (Jia et al. "A novel 10 method of Multiplexed Competitive Antibody Binning for the characterization of monoclonal antibodies" *J. Immunological Methods* (2004) 288, 91-98) y resonancia de plasmón superficial (Song et al. "Epitope Mapping of Ibalizumab, a Humanized AntiCD4 Monoclonal Antibody with Anti-HIV-1 Activity in Infected Patients" *J. Virol.* (2010) 84, 6935-42). Un método ejemplar para determinar la competencia cruzada se describe en el Ejemplo 5. Normalmente, 15 cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %. En algunos casos, la unión se inhibe al menos en un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más.

#### Polinucleótidos que codifican anticuerpos OSMR

20 [0109] Se describen ácidos nucleicos o ácidos nucleicos aislados que codifican un anticuerpo OSMR, como se define en el presente documento. Los ácidos nucleicos preferidos incluyen aquellos que codifican las cadenas ligeras y pesadas ejemplares descritas en el presente documento.

25 [0110] Un ácido nucleico ejemplar que codifica Ab2 LC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:22.

30 [0111] Un ácido nucleico ejemplar que codifica Ab2 HC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:4. Un ácido nucleico ejemplar que codifica una variante de Ab2 HC es un ácido nucleico que comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO:48.

35 [0112] También se divultan variantes de polinucleótidos (p. ej., debido a degeneración) que codifican las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento.

40 [0113] También se proporciona en el presente documento un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido, en el que dicho polinucleótido codifica uno o más polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de

45 1. una secuencia de dominio variable de cadena ligera que es al menos 90 % idéntica a una secuencia de dominio variable de cadena ligera expuesta en SEQ ID NO:28;

50 2. una secuencia del dominio variable de la cadena pesada que es al menos 90 % idéntica a una secuencia del dominio variable de la cadena pesada expuesta en SEQ ID NO:10;

55 3. un dominio variable de cadena ligera de (1) y un dominio variable de cadena pesada de (2).

45 [0114] También se proporciona en el presente documento un ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido, en el que dicho polinucleótido codifica uno o más polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera CDR1 (SEQ ID NO:31), CDR2 (SEQ ID NO:34), CDR3 (SEQ ID NO:37) y una cadena pesada CDR1 (SEQ ID NO:13), CDR2 (SEQ ID NO:16), CDR3 (SEQ ID NO:19) de Ab2. También se proporciona en el presente documento un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:54. También se proporciona en el presente documento un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:51.

55 [0115] Las secuencias de nucleótidos correspondientes a las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, para usarse como sondas o cebadores para el aislamiento de ácidos nucleicos o como secuencias de consulta para búsquedas en bases de datos, se pueden obtener mediante "retrotraducción" de las secuencias de aminoácidos, o mediante identificación de regiones de identidad de aminoácidos con polipéptidos para los cuales se ha identificado la secuencia de ADN codificante. Se puede emplear el conocido procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para aislar y amplificar una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo OSMR. Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados de la combinación de fragmentos de ADN se emplean como cebadores 5' y 3'. Los oligonucleótidos pueden contener además sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, para facilitar la inserción de la combinación amplificada de fragmentos de ADN en un vector de expresión. Las técnicas de PCR se describen en Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), págs. 189-196; y *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al, eds., Academic Press, Inc. (1990).

**[0116]** Las moléculas de ácido nucleico incluyen ADN y ARN tanto en forma monocatenaria como bicatenaria, así como las correspondientes secuencias complementarias. El ADN incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintetizado químicamente, ADN amplificado por PCR y combinaciones de los mismos. Las moléculas de ácido nucleico incluyen genes de longitud completa o moléculas de ADNc así como una combinación de fragmentos de los mismos.

5 Los ácidos nucleicos se derivan preferentemente de fuentes humanas, pero también incluyen aquellos derivados de especies no humanas.

**[0117]** En algunos casos, los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos aislados. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico que se ha separado de secuencias genéticas adyacentes presentes en el genoma del organismo del que se aisló el ácido nucleico, en el caso de ácidos nucleicos aislados de fuentes naturales. En el caso de ácidos nucleicos sintetizados enzimáticamente a partir de una plantilla o químicamente, como por ejemplo productos de PCR, moléculas de ADNc u oligonucleótidos, se entiende que los ácidos nucleicos resultantes de tales procesos son ácidos nucleicos aislados. Una molécula de ácido nucleico aislada se refiere a una molécula de ácido nucleico en forma de un fragmento separado o como componente de una construcción de ácido nucleico más grande. En un caso, los ácidos nucleicos están sustancialmente libres de material endógeno contaminante. La molécula de ácido nucleico se ha derivado preferiblemente de ADN o ARN aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación de las secuencias de nucleótidos que la componen mediante métodos bioquímicos estándar (tales como los descritos en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Tales secuencias se proporcionan y/o construyen preferiblemente en forma de un marco de lectura abierto ininterrumpido por secuencias internas no traducidas, o intrones, que normalmente están presentes en genes eucarióticos. Las secuencias de ADN no traducido pueden estar presentes en 5' o 3' de un marco de lectura abierto, donde las mismas no interfieren con la manipulación o expresión de la región codificante.

**[0118]** También se describen ácidos nucleicos o ácidos nucleicos aislados que se hibridan en condiciones moderadamente rigurosas, y más preferiblemente en condiciones muy rigurosas, con ácidos nucleicos que codifican anticuerpos OSMR como se describe en el presente documento. Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9) establecen los parámetros básicos que afectan la elección de las condiciones de hibridación y la orientación para diseñar condiciones adecuadas. y 11; y Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6.3-6.4), y puede ser determinado fácilmente por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica basándose en dependiendo, por ejemplo, de la longitud y/o composición de bases del ADN. Una forma de lograr condiciones moderadamente rigurosas implica el uso de una solución de prelavado que contenga 5 x SSC, 0,5 % de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), tampón de hibridación de aproximadamente 50 % de formamida, 6 x SSC y una temperatura de hibridación de aproximadamente 55°C. grados C (u otras soluciones de hibridación similares, tales como una que contenga aproximadamente 50 % de formamida, con una temperatura de hibridación de aproximadamente 42 grados C), y condiciones de lavado de aproximadamente 60 grados C, en 0,5 x SSC, 0,1 % SDS. Generalmente, las condiciones muy estrictas se definen como condiciones de hibridación como las anteriores, pero con lavado a aproximadamente 68 grados C, 0,2 x SSC, 0,1 % SDS. SSPE (1xSSPE es NaCl 0,15 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) se puede sustituir por SSC (1xSSC es NaCl 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en la hibridación y tampones de lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de que se completa la hibridación. Debe entenderse que la temperatura de lavado y la concentración de sal de lavado se pueden ajustar según sea necesario para lograr un grado deseado de rigurosidad aplicando los principios básicos que gobiernan las reacciones de hibridación y la estabilidad dúplex, como conocen los expertos en la técnica y se describen más adelante (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989). Cuando se hibrida un ácido nucleico con un ácido nucleico diana de secuencia desconocida, la longitud híbrida se supone que es la del ácido nucleico que se hibrida. Cuando se hibridan ácidos nucleicos de secuencia conocida, la longitud del híbrido se puede determinar alineando las secuencias de los ácidos nucleicos e identificando la región o regiones de complementariedad de secuencia óptima. La temperatura de hibridación para híbridos que se prevé que tengan menos de 50 pares de bases de longitud debe ser de 5 a 10 grados C menor que la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) del híbrido, donde la T<sub>m</sub> se determina según las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, T<sub>m</sub> (grados C) = 2 (n.<sup>o</sup> de bases A + T) + 4 (n.<sup>o</sup> de bases G + C). Para híbridos de más de 18 pares de bases de longitud, T<sub>m</sub> (grados C) = 81,5 + 16,6 (log<sub>10</sub> [Na<sup>+</sup>]) + 0,41 (% G + C)-(600/N), donde N es el número de bases en el híbrido, y [Na<sup>+</sup>] es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ([Na<sup>+</sup>] para 1xSSC = 0,165 M). Preferiblemente, cada uno de dichos ácidos nucleicos de hibridación tiene una longitud que es de al menos 15 nucleótidos (o más preferiblemente al menos 18 nucleótidos, o al menos 20 nucleótidos, o al menos 25 nucleótidos, o al menos 30 nucleótidos, o al menos 40 nucleótidos, o lo más preferiblemente al menos 50 nucleótidos), o al menos el 25 % (más preferiblemente al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, y lo más preferiblemente al menos el 80 %) de la longitud del ácido nucleico al que se hibrida, y tiene al menos un 60 % de identidad de secuencia (más preferiblemente al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % y lo más preferiblemente al menos 99,5 %) con el ácido nucleico con el que se hibrida, donde la identidad de secuencia se determina comparando la secuencias de los ácidos nucleicos que se hibridan cuando se alinean para maximizar el solapamiento y la identidad mientras se minimizan los espacios entre secuencias como se describe con más detalle anteriormente.

5 [0119] Las variantes descritas en el presente documento se preparan normalmente mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN que codifica el anticuerpo, usando mutagénesis en casete o PCR u otras técnicas bien conocidas en la técnica, para producir ADN que codifica la variante y luego expresando el ADN recombinante en cultivo celular como se describe en este documento.

10 [0120] Como apreciarán los expertos en la técnica, debido a la degeneración del código genético, se puede producir un número extremadamente grande de ácidos nucleicos, todos los cuales codifican las CDR (y las cadenas pesadas y ligeras u otros componentes del anticuerpo) divulgadas en este documento. Por lo tanto, habiendo identificado una secuencia de aminoácidos particular, los expertos en la técnica podrían producir cualquier número de ácidos nucleicos diferentes, simplemente modificando la secuencia de uno o más codones de una manera que no cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

15 [0121] También se describen en el presente documento sistemas de expresión y construcciones en forma de plásmidos, vectores de expresión, cassetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como anteriormente. Además, se describen células huésped que comprenden dichos sistemas o construcciones de expresión.

20 [0122] Normalmente, los vectores de expresión utilizados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias, a veces denominadas colectivamente "secuencias flanqueantes", incluirán normalmente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme donante y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción de polipéptidos, un sitio de unión a ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región de polienlazador para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar y un elemento marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se analiza a continuación.

30 [0123] Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante de "etiqueta", es decir, una molécula de oligonucleótido situada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante del anticuerpo OSMR; la secuencia de oligonucleótidos codifica poliHis (como hexaHis) u otra "etiqueta" como FLAG, HA (virus de la influenza hemaglutinina) o *myc*, para la cual existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta normalmente se fusiona al polipéptido tras la expresión del polipéptido y puede servir como medio para la purificación por afinidad o la detección del anticuerpo OSMR de la célula huésped. La purificación por afinidad se puede lograr, por ejemplo, mediante cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta se puede eliminar posteriormente del anticuerpo OSMR purificado mediante diversos medios, tales como el uso de ciertas peptidasas para la escisión.

40 [0124] Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula huésped), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente), sintéticas o nativas. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariótico o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional y pueda ser activada por la maquinaria de la célula huésped.

45 [0125] Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores pueden obtenerse mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica. Normalmente, las secuencias flanqueantes útiles en el presente documento se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o mediante digestión con endonucleasas de restricción y, por lo tanto, se pueden aislar de la fuente de tejido adecuada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, 50 se puede conocer la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante. En este caso, la secuencia flanqueante se puede sintetizar usando los métodos descritos en el presente documento para la síntesis o clonación de ácidos nucleicos.

55 [0126] Ya sea que se conozca toda o sólo una parte de la secuencia flanqueante, se puede obtener usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o seleccionando una biblioteca genómica con una sonda adecuada tal como un oligonucleótido y/o un fragmento de secuencia flanqueante de la misma o otra especie. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, se puede aislar un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante de un fragmento más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede lograrse mediante digestión con endonucleasa de restricción para producir el fragmento de ADN adecuado seguido del aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA) u otros métodos conocidos por el experto. La selección de enzimas adecuadas para lograr este propósito será fácilmente evidente para un experto en la técnica.

60 [0127] Un origen de replicación suele ser parte de aquellos vectores de expresión procarióticos adquiridos comercialmente, y el origen ayuda a la amplificación del vector en una célula huésped. Si el vector de elección no contiene un origen de sitio de replicación, uno puede sintetizarse químicamente basándose en una secuencia conocida

5 y ligarse al vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas y diversos orígenes virales (p. ej., SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o virus del papiloma tales como HPV o BPV) son útiles para clonar vectores en células de mamíferos. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamíferos (p. ej., el origen SV40 se usa a menudo sólo porque también contiene el promotor temprano del virus).

10 [0128] Una secuencia de terminación de la transcripción suele estar situada en 3' con respecto al extremo de una 15 región codificante de polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Normalmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procarióticas es un fragmento rico en GC seguido de una secuencia poli-T. Si bien la secuencia se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se compra comercialmente como parte de un vector, 20 también se puede sintetizar fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos como los descritos en el presente documento.

25 [0129] Un gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped cultivada en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células huésped procarióticas; (b) complementar las deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministrar 30 nutrientes críticos no disponibles en medios complejos o definidos. Los marcadores seleccionables específicos son el gen de resistencia a la kanamicina, el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de resistencia a la tetraciclina. Ventajosamente, también se puede utilizar un gen de resistencia a la neomicina para la selección en células huésped tanto procarióticas como eucariotas.

35 [0130] Se pueden usar otros genes seleccionables para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el proceso en el que los genes necesarios para la producción de una proteína crítica para el crecimiento o la supervivencia celular se reiteran en conjunto dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos incluyen genes de dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa sin promotor. Los transformantes de células de mamífero se colocan bajo presión de selección en la que sólo los transformantes están adaptados de forma única para sobrevivir en virtud 40 del gen seleccionable presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio aumenta sucesivamente, conduciendo así a la amplificación tanto del gen seleccionable como del ADN que codifica otro gen, tal como un anticuerpo que se une al polipéptido OSMR. Como resultado, se sintetizan mayores cantidades de un polipéptido tal como un anticuerpo OSMR a partir del ADN amplificado.

45 [0131] Generalmente es necesario un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de ShineDalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento normalmente está situado en 3' con respecto al promotor y en 5' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido que se va a expresar. En ciertos casos, una o más regiones codificantes pueden estar operativamente unidas a un 50 sitio de unión a ribosoma interno (IRES), lo que permite la traducción de dos marcos de lectura abiertos a partir de una única transcripción de ARN.

55 [0132] En algunos casos, como cuando se desea la glicosilación en un sistema de expresión de células huésped eucariotas, se pueden manipular las diversas presecuencias o prosecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de la peptidasa de un péptido señal particular, o agregar prosecuencias, que también pueden afectar la glicosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición-1 (con relación al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos adicionales incidentales a la expresión, que pueden no haberse eliminado totalmente. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o dos residuos de aminoácidos que se encuentran en el sitio de escisión de la peptidasa, unidos al extremo amino. 60 Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión de enzimas puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido deseado, si la enzima corta en dicha área dentro del polipéptido maduro.

65 [0133] Los vectores de expresión y clonación descritos en el presente documento normalmente contendrán un promotor que es reconocido por el organismo huésped y unido operativamente a la molécula que codifica el anticuerpo OSMR. Los promotores son secuencias no transcritas ubicadas aguas arriba (es decir, 5') del codón de inicio de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles elevados de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura. Los promotores constitutivos, por otra parte, transcriben uniformemente el gen al que están unidos operativamente, es decir, con poco o ningún control sobre la expresión génica. Se conocen bien un gran número de promotores, reconocidos por una variedad de células huésped potenciales. Un promotor adecuado se une operativamente al ADN que codifica la cadena pesada o la cadena ligera que comprende un anticuerpo OSMR para su uso con la invención eliminando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia del promotor deseada en el vector.

5 [0134] También se conocen bien en la técnica promotores adecuados para su uso con levaduras huéspedes. Los potenciadores de levadura se utilizan ventajosamente con promotores de levadura. Los promotores adecuados para su uso con células huésped de mamíferos son bien conocidos e incluyen, entre otros, los obtenidos a partir de los genomas de virus tales como el virus del polioma, el virus de la viruela aviar, los adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y más preferiblemente virus del simio 40 (SV40). Otros promotores de mamíferos adecuados incluyen promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

10 [0135] Promotores adicionales que pueden ser de interés incluyen, entre otros: promotor temprano SV40 (Benoist et al., 1981, *Nature* 290:304-310); promotor CMV (Thomsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. EE. UU.* 81:659-663); el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); promotor de timidina quinasa del herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 78:1444-1445); secuencias promotoras y reguladoras del gen de metalotionina Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); y promotores procarióticos tales como el promotor de betalactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 75:3727-3731); o el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 80:21-25). También se describen las siguientes regiones de control transcripcional de animales, que exhiben especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Omitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de la insulina que está activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444); la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en testículos, mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495); la región de control del gen de la albúmina que está activa en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); la región de control del gen de la alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 253:53-58); la región de control del gen alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); la región de control del gen de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en las células oligodendrocitos del cerebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que está activa en el músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotrópicos que está activa en el hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

35 [0136] Se puede insertar una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción del ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada que comprende un anticuerpo OSMR para su uso con la invención por parte de eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis, generalmente de entre 10 y 300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición, habiéndose encontrado en las posiciones 5' y 3' de la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamíferos (p. ej., globina, elastasa, albúmina, alfafetoproteína e insulina). Sin embargo, normalmente se utiliza un potenciador de un virus. El potenciador SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma y los potenciadores de adenovirus conocidos en la técnica son elementos potenciadores ejemplares para la activación de promotores eucarióticos. Si bien se puede colocar un potenciador en el vector en 5' o 3' con respecto a una secuencia codificante, normalmente se ubica en un sitio 5' del promotor. Una secuencia que codifica una secuencia señal nativa o heteróloga apropiada (secuencia líder o péptido señal) puede incorporarse en un vector de expresión para promover la secreción extracelular del anticuerpo. La elección del péptido señal o líder depende del tipo de células huésped en las que se va a producir el anticuerpo, y una secuencia señal heteróloga puede reemplazar la secuencia señal nativa. Ejemplos de péptidos señal que son funcionales en células huésped de mamíferos incluyen los siguientes: la secuencia señal para interleucina-7 (IL-7) descrita en la Patente de EE. UU. N° 4.965.195; la secuencia señal para el receptor de interleucina-2 descrita en Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; el péptido señal del receptor de interleucina-4 descrito en la patente EP N° 0367 566; el péptido señal del receptor de interleucina-1 tipo I descrito en la Patente de EE. UU. N° 4.968.607; el péptido señal del receptor de interleucina-1 tipo II descrito en la patente EP N° 0460846.

55 [0137] El vector puede contener uno o más elementos que faciliten la expresión cuando el vector se integra en el genoma de la célula huésped. Los ejemplos incluyen un elemento EASE (Aldrich et al. 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) y una región de unión a la matriz (MAR). Los MAR median en la organización estructural de la cromatina y pueden aislar al vector integrado del efecto de "posición". Por tanto, los MAR son particularmente útiles cuando el vector se utiliza para crear transfectantes estables. En la técnica se conocen varios ácidos nucleicos que contienen MAR naturales y sintéticos, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N°s 6.239.328; 7.326.567; 6.177.612; 6.388.066; 6.245.974; 7.259.010; 6.037.525; 7.422.874; 7.129.062.

60 [0138] Los vectores de expresión pueden construirse a partir de un vector inicial tal como un vector disponible comercialmente. Dichos vectores pueden contener o no todas las secuencias flanqueantes deseadas. Cuando una o más de las secuencias flanqueantes descritas en el presente documento aún no están presentes en el vector, pueden

obtenerse individualmente y ligarse al vector. Los métodos utilizados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes son bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 **[0139]** Despues de que se haya construido el vector y de que se haya insertado en el sitio apropiado del vector una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera, una cadena pesada o una cadena ligera y una cadena pesada que comprende una secuencia de unión al antígeno OSMR, se puede insertar el vector completo. en una célula huésped adecuada para la amplificación y/o expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un anticuerpo OSMR en una célula huésped seleccionada se puede lograr mediante métodos bien conocidos que incluyen transfección, infección, coprecipitación con fosfato cálcico, electroporación, microinyección, 10 lipofección, transfección mediada por DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped a utilizar. Estos métodos y otros métodos adecuados son bien conocidos por el experto en la técnica y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001, *supra*.

15 **[0140]** Una célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, sintetiza un anticuerpo OSMR que posteriormente puede recolectarse del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta en el medio) o directamente de la célula huésped que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de varios factores, tales como niveles de expresión deseados, modificaciones polipeptídicas que son deseables o necesarias para la actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y facilidad de plegamiento en una molécula biológicamente activa. Una célula huésped puede ser eucariota o procariótica.

20 **[0141]** Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen, entre otras, líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC) y cualquier línea celular utilizada en un sistema de expresión conocido en la técnica puede utilizarse para fabricar los polipéptidos recombinantes. En general, las células huésped se transforman con un vector de expresión recombinante que comprende ADN que codifica un polipéptido de anticuerpo anti-OSMR deseado. Entre las células huésped que pueden emplearse se encuentran procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Los procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen células de insectos y líneas celulares establecidas de origen mamífero. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, *Cell* 23:175), células L, células 293, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), o sus derivados tales como Veggie CHO y líneas celulares relacionadas que crecen en medios libres de suero (Rasmussen *et al.*, 1998, *Cytotechnology* 28: 31), células HeLa, BHK (ATCC CRL 10) líneas celulares, y la línea celular CVI/EBNA derivada de la línea celular CVI de riñón de mono verde africano (ATCC CCL 70) como se describe por McMahan *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10: 2821, células de riñón embrionario humano tales como 293, 293 EBNA o MSR 30 293, células epidérmicas humanas A431, células humanas Colo205, otras líneas celulares de primates transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas de cultivos *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HL-60, U937, HaK o Jurkat. Opcionalmente, se pueden usar líneas celulares de mamífero tales como HepG2/3B, KB, NIH 3T3 o S49, por ejemplo, para la expresión del polipéptido cuando es deseable usar el polipéptido en diversos ensayos indicadores o de transducción de señales. Alternativamente, es posible producir el polipéptido en eucariotas 40 inferiores tales como levaduras o en procariotas tales como bacterias. Las levaduras adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, *Candida* o cualquier cepa de levadura capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Las cepas bacterianas adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar polipéptidos heterólogos. Si el polipéptido se elabora en levaduras o bacterias, puede ser deseable modificar el polipéptido producido allí, por 45 ejemplo, mediante fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, para obtener el polipéptido funcional. Tales uniones covalentes se pueden lograr usando métodos químicos o enzimáticos conocidos. El polipéptido también se puede producir uniendo operativamente el ácido nucleico o el ácido nucleico aislado a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insectos, y empleando un sistema de expresión de insectos. Los 50 materiales y métodos para sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto están disponibles comercialmente en forma de kit de, por ejemplo, Invitrogen, San Diego, CA, EE. UU. (el kit MaxBac<sup>®</sup>), y tales métodos son bien conocidos en la técnica, como se describe en Summers y Smith, Boletín de la Estación Experimental Agrícola de Texas No. 1555 (1987), y Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988). También podrían emplearse sistemas de traducción libres de células para producir polipéptidos usando ARN derivados de construcciones de ácidos nucleicos divulgadas en el presente documento. Pouwels *et al.* describen vectores de clonación y expresión apropiados para su 55 uso con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levaduras y de mamíferos. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nueva York, 1985). Una célula huésped que comprende un ácido nucleico o un ácido nucleico aislado, preferiblemente unido operativamente a al menos una secuencia de control de expresión, es una "célula huésped recombinante".

60 **[0142]** En ciertos casos, las líneas celulares se pueden seleccionar determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen constitutivamente anticuerpos con propiedades de unión a OSMR. En otro caso, se puede seleccionar una línea celular del linaje de células B que no produce su propio anticuerpo pero que tiene capacidad para producir y secretar un anticuerpo heterólogo.

65 **Anticuerpos OSMR que agotan las células**

5 [0143] El anticuerpo OSMR para uso con la invención se une a OSMR e inhibe la unión de OSM humana y de IL-31 humana a OSMR humana y reduce la señalización mediada por OSM humana y IL-31 humana en células que expresan OSMR humana. En determinadas formas de realización, el anticuerpo OSMR se une a OSMR y se dirige a una célula que expresa OSMR para su agotamiento. Por consiguiente, en diversos aspectos, el anticuerpo OSMR inhibe la unión de OSM humana y de IL-31 humana a OSMR humano y puede dirigirse a la célula que expresa OSMR humana para su agotamiento.

10 10 [0144] Los anticuerpos OSMR que agotan las células son particularmente útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados con la sobreexpresión de OSMR, por ejemplo, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad o trastorno asociado con la deposición o remodelación de la matriz extracelular. Métodos para apuntar a células con anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

#### Conjugados de anticuerpos y fármacos

15 15 [0145] También se prevén conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). Se puede utilizar una molécula conectora para conjugar el fármaco con el anticuerpo. En la técnica se conoce una amplia variedad de enlazadores y fármacos útiles en la tecnología ADC (véanse US20090028856; US2009/0274713; US2007/0031402; WO2005/084390; WO2009/099728; US5208020; US5416064; US5475092; 5585499; 6436931; 6372738; y 6340701).

20 20 Enlazadores

25 25 [0146] También se prevé un ADC que comprende un conector formado por uno o más componentes del conector. Los componentes del conector a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo, maleimidopropanoilo, valina-citrulina, alanina-fenilalanina, p-aminobenciloxicarbonilo y los resultantes de la conjugación con reactivos del conector, incluidos, entre otros, 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1 carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC", también denominado en el presente documento también como "MCC") y aminobenzoato de (4-yodo-acetilo) de N-succinimidilo ("SIAB").

30 30 [0147] Los enlazadores pueden ser un enlazador "escindible" o un enlazador "no escindible" (Ducry and Stump, Bioconjugate Chem. 2010, 21, 5-13). Los enlazadores escindibles están diseñados para liberar el fármaco cuando se someten a ciertos factores ambientales, por ejemplo, cuando internalizado en la célula diana. Los enlazadores escindibles incluyen enlazadores lábiles a ácidos, enlazadores sensibles a proteasa, enlazadores fotolábiles, enlazadores dimetilo o enlazadores que contienen disulfuro. Los conectores no escindibles tienden a permanecer asociados covalentemente con al menos un aminoácido del anticuerpo y el fármaco tras su internalización y degradación dentro de la célula diana. Un conector no escindible ejemplar es MCC.

#### Anticuerpos con función efectora mejorada

40 40 [0148] Una de las funciones de la porción Fc de un anticuerpo es comunicarse con el sistema inmunológico cuando el anticuerpo se une a su objetivo. Esto se considera "función efectora". La comunicación conduce a citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). ADCC y ADCP están mediados por la unión de Fc a receptores Fc en la superficie de las células del sistema inmunológico. La CDC está mediada por la unión del Fc con proteínas del sistema del complemento, por ejemplo, C1q.

45 45 [0149] Las subclases de IgG varían en su capacidad para mediar funciones efectoras. Por ejemplo, IgG1 es muy superior a IgG2 e IgG4 en la mediación de ADCC y CDC. Por tanto, en formas de realización en las que una célula que expresa OSMR está destinada a ser destruida, se preferiría un anticuerpo IgG1 anti-OSMR.

50 50 [0150] La función efectora de un anticuerpo se puede aumentar o disminuir introduciendo una o más mutaciones en el Fc. Las formas de realización para uso con la invención incluyen anticuerpos que tienen un Fc diseñado para aumentar la función efectora (US 7.317.091 y Strohl, Curr. Opin. Biotech., 20:685-691, 2009). Las moléculas de Fc de IgG1 ejemplares que tienen una función efectora aumentada incluyen (según el esquema de numeración de Kabat) aquellas que tienen las siguientes sustituciones:

55 S239D/I332E

S239D/A330S/I332E

60 S239D/A330L/I332E

S298A/D333A/K334A

65 P247I/A339D

P247I/A339Q

	D280
5	H/K290S
	D280H/K290S/S298D
	D280H/K290S/S298V
10	F243L/R292P/Y300L
	F243L/R292P/Y300L/P396L
	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
15	G236A/S239D/I332E
	K326A/E333A
20	K326W/E333S
	K290E/S298G/T299A
	K290N/S298G/T299A
25	K290E/S298G/T299A/K326E
	K290N/S298G/T299A/K326E
30	<b>[0151]</b> Otras formas de realización para su uso con la invención incluyen anticuerpos que tienen un Fc diseñado para disminuir la función efectora. Las moléculas de Fc ejemplares que tienen una función efectora disminuida incluyen (según el esquema de numeración de Kabat) aquellas que tienen las siguientes sustituciones:
35	N297A (IgG1)
	L234A/L235A (IgG1)
	V234A/G237A (IgG2)
40	L235A/G237A/E318A (IgG4)
	H268Q/V309L/ A330S/A331S (IgG2)
	C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)
45	C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)
	L234F/L235E/P331S (IgG1)
50	S267E/L328F (IgG1)
	<b>[0152]</b> Otro método para aumentar la función efectora de las proteínas que contienen IgG Fc es reducir la fucosilación del Fc. La eliminación de la fucosa central de los oligosacáridos de tipo complejo biantenario unidos al Fc aumentó considerablemente la función efectora de ADCC sin alterar la unión al antígeno o la función efectora de CDC. Se conocen varias formas de reducir o suprimir la fucosilación de moléculas que contienen Fc, por ejemplo, anticuerpos. Estos incluyen la expresión recombinante en determinadas líneas celulares de mamíferos, incluida una línea celular inactivada para FUT8, una línea CHO variante Lec13, una línea celular de hibridoma de rata YB2/0, una línea celular que comprende un pequeño ARN de interferencia específicamente contra el gen FUT8 y una línea celular que coexpresa $\beta$ -1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III y $\alpha$ -manosidasa II de Golgi. Alternativamente, la molécula que contiene Fc puede expresarse en una célula no de mamífero tal como una célula vegetal, una levadura o una célula procariótica, por ejemplo, <i>E. coli</i> . Por lo tanto, en ciertas formas de realización, un anticuerpo para usar con la invención, por ejemplo, Ab2, tiene fucosilación reducida o carece de fucosilación por completo.
55	
60	

**Composiciones farmacéuticas**

**[0153]** También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o una pluralidad de anticuerpos para su uso con la invención junto con diluyentes, vehículos, solubilizadores, emulsionantes, conservantes y/o adyuvantes farmacéuticamente eficaces. Las composiciones farmacéuticas incluyen, entre otras, composiciones líquidas, congeladas y liofilizadas.

5 **[0154]** Preferiblemente, los materiales de formulación no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. Se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de unión a OSMR.

10 **[0155]** La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, entre otros, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina, prolina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sales (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido súrbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato, trítón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes mejoradores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol sorbitol); vehículos de reparto; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, edición de 18", (AR Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

30 **[0156]** Un experto en la técnica determinará una composición farmacéutica óptima dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosis deseada. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo y la velocidad de eliminación in vivo de los anticuerpos para su uso con la invención. El vehículo o vehículo principal en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o vehículo adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente suplementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Otros vehículos ejemplares son solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, y pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del mismo. Las composiciones de anticuerpos OSMR se pueden preparar para almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, el producto de anticuerpo OSMR se puede formular como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

45 **[0157]** Se pueden seleccionar composiciones farmacéuticas para administración parenteral. Alternativamente, se pueden seleccionar composiciones para inhalación o para administración a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de los conocimientos de la técnica. Los componentes de la formulación están presentes preferiblemente en concentraciones que sean aceptables para el sitio de administración. Se pueden usar tampones para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente más bajo, normalmente dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

55 **[0158]** Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas se pueden proporcionar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos, que comprende el anticuerpo OSMR deseado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que el anticuerpo OSMR se formula como una solución isotónica estéril, adecuadamente conservada. La preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerpcionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que pueden proporcionar una liberación controlada o sostenida del producto que se puede administrar mediante inyección de depósito. También se puede utilizar ácido hialurónico, que tiene el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Se pueden usar dispositivos implantables de administración de fármacos para introducir el anticuerpo deseado.

5 [0159] Se pueden formular composiciones farmacéuticas para inhalación. En estos casos, los anticuerpos OSMR se formulan ventajosamente como un polvo seco inhalable. Las soluciones para inhalación de anticuerpos OSMR también se pueden formular con un propulsor para administración en aerosol. En determinadas formas de realización, las soluciones se pueden nebulizar. Por lo tanto, los métodos de formulación y administración pulmonar se describen con más detalle en la solicitud de patente internacional Nº PCT/US94/001875 y describen la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

10 [0160] También se contempla que las formulaciones puedan administrarse por vía oral. Los anticuerpos OSMR que se administran de esta manera se pueden formular con o sin vehículos utilizados habitualmente en la combinación de formas de dosificación sólidas tales como tabletas y cápsulas. Se puede diseñar una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción del anticuerpo OSMR. También se pueden emplear diluyentes, saborizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegrantes de tabletas y aglutinantes.

15 [0161] Las composiciones farmacéuticas adicionales resultarán evidentes para los expertos en la técnica, incluidas formulaciones que implican anticuerpos OSMR en formulaciones de liberación sostenida o controlada. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional Nº PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Las preparaciones de liberación sostenida pueden incluir matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (como se describe en la Patente de EE. UU. Nº 3.773.919 y la publicación de solicitud de patente europea Nº EP 058481, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al., 1983), Biopolymers 2:547-556), polí(metacrilato de 2-hidroxietilo) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Matre. Res. 15:167-277 y Langer, 1982, Chem. Technology. 12:98-105), acetato de etilenvinilo (Langer et al., 1981, *supra*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (Publicación de Solicitud de Patente Europea Nº EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Eppstein et al., 1985, Proc. Nacional. Acad. Science. EE. UU. 82:3688-3692; Publicaciones de Solicituds de Patente Europea Nºs. EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

30 [0162] Las composiciones farmacéuticas utilizadas para la administración *in vivo* normalmente se proporcionan como preparaciones estériles. La esterilización se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización usando este método puede realizarse antes o después de la liofilización y reconstitución. Las composiciones para administración parenteral se pueden almacenar en forma liofilizada o en una solución. Las composiciones parenterales generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica.

40 [0163] Se incluyen formulaciones de anticuerpos OSMR autoamortiguadores, que pueden usarse como composiciones farmacéuticas, como se describe en la solicitud de patente internacional WO 06138181A2 (PCT/US2006/022599).

45 [0164] Se proporcionan composiciones de anticuerpos OSMR, particularmente composiciones farmacéuticas de anticuerpos OSMR que comprenden, además del anticuerpo OSMR, uno o más excipientes tales como los descritos ilustrativamente en esta sección y en otros lugares del presente documento. Los excipientes se pueden usar a este respecto para una amplia variedad de propósitos, tales como ajustar las propiedades físicas, químicas o biológicas de las formulaciones, tales como el ajuste de la viscosidad, y/o procesos para mejorar la eficacia y/o estabilizar tales formulaciones y procesos contra la degradación y deterioro debido, por ejemplo, a tensiones que ocurren durante la fabricación, envío, almacenamiento, preparación previa al uso, administración y posteriormente.

55 [0165] Está disponible una variedad de exposiciones sobre materiales y métodos de estabilización y formulación de proteínas útiles a este respecto, tales como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," en: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002), y Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), particularmente en partes pertinentes a excipientes y procesos de los mismos para formulaciones de proteínas autoamortiguantes de acuerdo con la presente invención, especialmente en lo que respecta a productos y procesos farmacéuticos de proteínas para usos veterinarios y/o médicos humanos.

60 [0166] Se pueden usar sales, por ejemplo, para ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una formulación y/o para mejorar la solubilidad y/o la estabilidad física de una proteína u otro ingrediente de una composición de acuerdo con la invención.

[0167] Como es bien sabido, los iones pueden estabilizar el estado nativo de las proteínas uniéndose a residuos cargados en la superficie de la proteína y protegiendo los grupos polares y cargados en la proteína y reduciendo la fuerza de sus interacciones electrostáticas, interacciones atractivas y repulsivas. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína uniéndose, en particular, a los enlaces peptídicos desnaturalizados (-CONH)

5 de la proteína. Además, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también puede reducir las interacciones electrostáticas intermoleculares y, por lo tanto, prevenir o reducir la agregación e insolubilidad de las proteínas.

[0168] Las especies iónicas difieren significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se han desarrollado varias 10 clasificaciones categóricas de iones y sus efectos sobre las proteínas que pueden usarse en la formulación de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Un ejemplo es la serie de Hofmeister, que clasifica los solutos iónicos y polares no iónicos según su efecto sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en solución. Los solutos estabilizadores se denominan "kosmotrópicos". Los solutos desestabilizadores se denominan 15 "caotrópicos". Los cosmotropos se utilizan comúnmente en altas concentraciones (p. ej., >1 molar de sulfato de amonio) para precipitar proteínas de la solución ("salación"). Los caotropos se utilizan comúnmente para dentaduras postizas y/o para solubilizar proteínas ("salación"). La eficacia relativa de los iones para la "salida" y la "salida" define su posición en la serie de Hofmeister.

[0169] Los aminoácidos libres se pueden utilizar en formulaciones de anticuerpos OSMR como agentes de carga, 20 estabilizadores y antioxidantes, así como otros usos estándar. Se pueden usar lisina, prolina, serina y alanina para estabilizar proteínas en una formulación. La glicina es útil en la liofilización para garantizar la estructura y las propiedades correctas de la torta. La arginina puede ser útil para inhibir la agregación de proteínas, tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas. La metionina es útil como antioxidante.

[0170] Los polioles incluyen azúcares, por ejemplo, manitol, sacarosa y sorbitol y alcoholes polihídricos tales como, 25 por ejemplo, glicerol y propilenglicol y, para los fines de discusión en el presente documento, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. Los polioles son cosmotrópicos. Son agentes estabilizantes útiles tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas para proteger las proteínas de procesos de degradación física y química. Los polioles también son útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones.

[0171] Un poliol útil es el manitol, comúnmente usado para asegurar la estabilidad estructural de la torta en 30 formulaciones liofilizadas. Asegura la estabilidad estructural de la torta. Generalmente se usa con un lioprotector, por ejemplo, sacarosa. El sorbitol y la sacarosa se encuentran entre los agentes preferidos para ajustar la tonicidad y como estabilizadores para proteger contra las tensiones de congelación y descongelación durante el transporte o la 35 preparación de productos a granel durante el proceso de fabricación. Los azúcares reductores (que contienen grupos aldehído o cetona libres), como la glucosa y la lactosa, pueden glicar los residuos de lisina y arginina de la superficie. Por lo tanto, generalmente no se encuentran entre los polioles preferidos. Además, los azúcares que forman especies reactivas, como la sacarosa, que se hidroliza a fructosa y glucosa en condiciones ácidas y, en consecuencia, genera 40 glicación, tampoco se encuentra entre los polioles preferidos. El PEG es útil para estabilizar proteínas y como crioprotector y puede usarse en la invención a este respecto.

[0172] Las formulaciones de anticuerpos OSMR pueden comprender además tensioactivos. Las moléculas de 45 proteínas pueden ser susceptibles a la adsorción en las superficies y a la desnaturalización y la consiguiente agregación en las interfaces aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estos efectos generalmente aumentan inversamente con la concentración de proteínas. Estas interacciones nocivas generalmente aumentan inversamente con la concentración de proteínas y normalmente se ven exacerbadas por la agitación física, como la generada durante el envío y manipulación de un producto.

[0173] Los tensioactivos se utilizan habitualmente para prevenir, minimizar o reducir la adsorción en la superficie. 50 Los tensioactivos útiles en la invención a este respecto incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitán y poloxámero 188.

[0174] Los tensioactivos también se utilizan comúnmente para controlar la estabilidad conformacional de las 55 proteínas. El uso de tensioactivos a este respecto es específico de las proteínas, ya que cualquier tensioactivo determinado normalmente estabilizará algunas proteínas y desestabilizará otras.

[0175] Los polisorbatos son susceptibles a la degradación oxidativa y, a menudo, tal como se suministran, contienen 60 cantidades suficientes de peróxidos para provocar la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de proteínas, especialmente la metionina. En consecuencia, los polisorbatos deben usarse con cuidado y, cuando se usan, deben emplearse en su concentración efectiva más baja. En este sentido, los polisorbatos ejemplifican la regla general de que los excipientes deben usarse en sus concentraciones efectivas más bajas.

[0176] Las formulaciones de anticuerpos OSMR pueden comprender además uno o más antioxidantes. Hasta cierto punto, la oxidación nociva de proteínas se puede prevenir en formulaciones farmacéuticas manteniendo niveles 65 adecuados de oxígeno y temperatura ambiente y evitando la exposición a la luz. También se pueden utilizar excipientes antioxidantes para prevenir la degradación oxidativa de las proteínas. Entre los antioxidantes útiles a este respecto se

encuentran los agentes reductores, los eliminadores de oxígeno/radicales libres y los agentes quelantes. Los antioxidantes para uso en formulaciones de proteínas terapéuticas de acuerdo con la invención son preferiblemente solubles en agua y mantienen su actividad durante toda la vida útil de un producto. A este respecto, EDTA es un antioxidante preferido según la invención.

5 [0177] Los antioxidantes pueden dañar las proteínas. Por ejemplo, los agentes reductores, como el glutatión en particular, pueden alterar los enlaces disulfuro intramoleculares. Por lo tanto, los antioxidantes se seleccionan para, entre otras cosas, eliminar o reducir suficientemente la posibilidad de que ellos mismos dañen las proteínas en la formulación.

10 [0178] Las formulaciones de acuerdo con la invención pueden incluir iones metálicos que son cofactores proteicos y que son necesarios para formar complejos de coordinación de proteínas, tales como zinc necesario para formar ciertas suspensiones de insulina. Los iones metálicos también pueden inhibir algunos procesos que degradan las proteínas. Sin embargo, los iones metálicos también catalizan procesos físicos y químicos que degradan las proteínas.

15 [0179] Se pueden utilizar iones de magnesio (10-120 mM) para inhibir la isomerización del ácido aspártico a ácido isoaspártico. Los iones  $\text{Ca}^{+2}$  (hasta 100 mM) pueden aumentar la estabilidad de la desoxirribonucleasa humana. Sin embargo,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  pueden desestabilizar la rhDNase. De manera similar,  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Sr}^{+2}$  pueden estabilizar el Factor VIII, puede ser desestabilizado por  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$ , y su agregación puede incrementarse por iones  $\text{Al}^{+3}$ .

20 [0180] Las formulaciones de anticuerpos OSMR pueden comprender además uno o más conservantes. Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales multidosis que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su función principal es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto durante toda la vida útil o el plazo de uso del medicamento. Los conservantes comúnmente utilizados incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso con parenterales de molécula pequeña, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyan conservantes puede ser un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizador (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante para limitar su uso en formulaciones de proteínas multidosis. Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos proteicos se han formulado para un solo uso. Sin embargo, cuando son posibles las formulaciones multidosis, tienen la ventaja adicional de permitir la comodidad del paciente y una mayor comercialización. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humano (hGH), donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha llevado a la comercialización de presentaciones en forma de pluma de inyección más convenientes y de usos múltiples. Actualmente se encuentran disponibles en el mercado al menos cuatro dispositivos tipo pluma que contienen formulaciones conservadas de hGH. Norditropin (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ (líquido, Genentech) y Genotropin (liofilizado, cartucho de doble cámara, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que Somatrop (Eli Lilly) está formulado con m-cresol.

25 [0181] Es necesario considerar varios aspectos durante la formulación y desarrollo de formas farmacéuticas conservadas. Se debe optimizar la concentración eficaz de conservante en el medicamento. Esto requiere probar un conservante determinado en la forma de dosificación con rangos de concentración que confieren eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de las proteínas.

30 [0182] Como era de esperar, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más desafiante que las formulaciones liofilizadas. Los productos liofilizados pueden liofilizarse sin conservante y reconstituirse con un conservante que contenga diluyente en el momento de su uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con formulaciones líquidas, la eficacia y estabilidad del conservante deben mantenerse durante toda la vida útil del producto (aproximadamente 18 a 24 meses). Un punto importante a tener en cuenta es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes excipientes.

35 [0183] Las formulaciones de anticuerpos OSMR generalmente se diseñarán para rutas y métodos de administración específicos, para dosis y frecuencias de administración específicas, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con rangos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas. Por lo tanto, las formulaciones pueden 40 diseñarse de acuerdo con la invención para su administración por cualquier vía adecuada, incluidas, entre otras, oral, ótica, oftálmica, rectal y vaginal, y por vías parenterales, incluyendo inyección intravenosa e intraarterial, inyección intramuscular y inyección subcutánea.

45 [0184] Una vez formulada la composición farmacéutica, ésta podrá almacenarse en viales estériles como solución, suspensión, gel, emulsión, sólido, cristal o como polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones se pueden 50 almacenar en una forma lista para usar o en una forma (p. ej., liofilizada) que se reconstituya antes de la administración. También se describen kits para producir una unidad de administración de dosis única. Cada uno de los kits puede 55 contener tanto un primer recipiente que tiene una proteína seca como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. En ciertos casos, se pueden proporcionar kits que contienen jeringas precargadas de una o varias cámaras (p. ej., jeringas para líquidos y liojeringas).

5 [0185] La cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que contiene anticuerpo OSMR a emplear dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la cual se usa el anticuerpo OSMR, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, tamaño corporal), superficie o tamaño del órgano) y/o condición (la edad y salud general) del paciente. Un médico puede titular la dosis y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis típica puede variar desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. La dosificación puede variar desde 1,0 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg, opcionalmente desde 10 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg o desde 100 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg.

10 15 [0186] Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo OSMR preferentemente da como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia o duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la aflicción de la enfermedad.

20 [0187] Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar usando un dispositivo médico. Ejemplos de dispositivos médicos para administrar composiciones farmacéuticas se describen en las Patentes de EE. UU. N°s 4.475.196; 4.439.196; 4.447.224; 4.447.233; 4.486.194; 4.487.603; 4.596.556; 4.790.824; 4.941.880; 5.064.413; 5.312.335; 5.312.335; 5.383.851; y 5.399.163.

#### Tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a OSMR

25 [0188] De acuerdo con la invención, un anticuerpo OSMR como se reivindica se utiliza en un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la señalización mediada por OSMR, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona entre enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

30 [0189] En el tratamiento de estos trastornos, el anticuerpo OSMR inhibe la unión de OSM humana y de IL-31 humana a OSMR humana y reduce la señalización mediada por OSM humana y IL-31 humana en células que expresan OSMR humana. También puede apuntar a las células del sistema inmunológico que expresan OSMR para su destrucción.

#### EJEMPLOS

35 [0190] Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar formas de realización o características específicas de la presente invención.

#### EJEMPLO 1: Producción de anticuerpos anti-OSMR utilizando la plataforma XENOMOUSE®

40 [0191] Se generaron anticuerpos completamente humanos dirigidos contra OSMR humano usando tecnología XENOMOUSE® (como se describe en las patentes de Estados Unidos números 6.114.598; 6.162.963; 6.833.268; 7.049.426; 7.064.244; y en Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21, 1994; Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-56, 1997; Green et al., *J. Ex. Med.* 188:483-95, 1998; y Kellermann et al., *Current Opinion in Biotechnology*, 13:593-7, 2002).

45 [0192] Para producir anticuerpos contra OSMR, se inmunizaron dos cepas diferentes de animales XENOMOUSE®, es decir, ratones XMG2-KL y XMG4-KL, con proteínas solubles OSMR-Fc humanas (preparadas por Amgen, Seattle, WA). Se usó una cantidad adecuada de inmunógeno (es decir, diez µg/ratón de proteína OSMR-Fc humana soluble) para la inmunización inicial de animales XENOMOUSE® según los métodos descritos en la solicitud de Patente de EE. UU. número de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las solicitudes de patente internacionales N°s WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000. Después de la inmunización inicial, las inmunizaciones de refuerzo posteriores de inmunógeno (cinco µg/ratón de OSMR humano soluble Proteína Fc) se administraron según un cronograma y durante el tiempo necesario para inducir un título adecuado de anticuerpo anti-OSMR en los ratones.

55 [0193] Los sueros se recogieron aproximadamente cuatro semanas después de la primera inyección y se determinaron títulos específicos mediante ELISA. El protocolo utilizado para titular los animales XENOMOUSE® fue el siguiente: Se colocaron placas de unión media Costar 3368 se recubrieron con neutravadina a 8 µg/ml(50 µl/pocillo) y se incubaron a 4 °C en 1XPBS/azida al 0,05 % durante la noche. Las placas se lavaron usando un lavado de 3 ciclos TiterTek con agua RO. Las placas se bloquearon usando 250 ml de 1XPBS/leche al 1 % y se incubaron durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo se lavó usando un lavado de 3 ciclos TiterTek con agua RO. A continuación, se capturó huOSMR-FNFH biotinilado (preparado por Amgen, Seattle, WA) a 2 µg/ml en 1XPBS/leche al 1 %/Ca2+ 10 mM (diluyente de ensayo) 50 µL/pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavó usando el lavado de 3 ciclos TiterTek con agua RO. Para el anticuerpo primario, los sueros se titularon 1:3 por duplicado desde 1:100. Esto se hizo en 50 µl de diluyente de ensayo /pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavó usando el lavado de 3 ciclos TiterTek con agua RO. El anticuerpo secundario era cabra anti-IgG humana Fc HRP a 400 ng/ml en diluyente de ensayo a 50 µl/pocillo. Esto se incubó

durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavó usando el lavado de 3 ciclos TiterTek con agua RO y se secó con toallas de papel. Para el sustrato, se usó una solución de TMB de un solo paso (Neogen, Lexington, Kentucky) (50  $\mu$ l/pocillo) y se dejó que el sustrato se desarrollara durante 30 minutos a temperatura ambiente.

5 [0194] Se identificaron los animales que presentaban títulos adecuados. Se identificaron cinco animales XMG2KL con una respuesta inmune IgG específica a OSMR. Se recogieron bazo y ganglios linfáticos de drenaje de estos animales y se agruparon para la generación de hibridomas. De manera similar, se recolectaron y avanzaron cinco animales XMG4KL con respuestas inmunes específicas como una campaña de detección de fusión separada. Se fusionaron células B enriquecidas de animales inmunes con células de mieloma no secretoras P3 x 63Ag8.653 ((American Type Culture Collection CRL-1580; Kearney et al, J. Immunol. 123: 1548-50, 1979) para generar hibridomas usando estándar técnicas (Kohler et al., Nature 256, 495-7, 1975).

10 [0195] A continuación, se sembraron los hibridomas a alta densidad (múltiples clones de hibridoma diferentes por pocillo) en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se cultivaron durante cuatro semanas. Se analizó la unión de los sobrenadantes de la línea de hibridoma a OSMR humano y de cynomolgus de longitud completa expresado en células 293T transfectadas transitoriamente mediante tecnología de ensayo de microvolumen fluorométrico (FMAT) (Applied Biosystems, Foster City, CA). Brevemente, en placas FMAT de 384 pocillos, se combinaron 40  $\mu$ l de una mezcla de 3.000 células transfectadas OSMR 293T y 15.000 células 293T parentales con 15  $\mu$ l de sobrenadante de hibridoma y 10  $\mu$ l de cadena ligera antihumana (hukappa/hulambda) Alexa647 (Invitrogen, Carlsbad, CA) anticuerpo secundario marcado (concentración final de 1,0  $\mu$ g/ml). A continuación, las placas se incubaron durante tres horas a temperatura ambiente y se leyó la fluorescencia utilizando el lector FMAT. Estos exámenes identificaron 885 líneas de hibridoma que se unen a OSMR tanto humano como cinomólogo.

#### EJEMPLO 2: Ensayos de bloqueo de OSMR en humanos

25 [0196] La capacidad de los anticuerpos OSMR para bloquear la señalización a través de OSMR humano se determinó mediante dos ensayos con oncostatina M humana (OSM) o interleucina 31 humana (IL-31) como ligando. En combinación, los ensayos se utilizaron para determinar si los anticuerpos podían inhibir la señalización de OSMR desencadenada por la unión de OSM y/o IL-31.

30 [0197] En la primera exploración, se evaluó la capacidad de los anticuerpos para bloquear la señalización de OSM a través de OSMR. La estimulación de fibroblastos primarios de pulmón humano normal con OSM induce la fosforilación de STAT3 y su posterior translocación al núcleo. Las células se sembraron a razón de 3000 células por pocillo en placas Costar de 384 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. Las células se trataron previamente con sobrenadantes de anticuerpos durante veinte minutos y luego se estimularon con OSM humana 80 pM durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron 3 veces en PBS, se fijaron con una solución de formaldehído al 3,5 %, se lavaron (3 veces en PBST) y se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 al 0,5 %. A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-fosfoSTAT3 durante una hora, se lavaron y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con AlexaFluor (todo contenido en el HitKit de Cellomics). Las placas se cubrieron y se leyeron en el instrumento ArrayScan utilizando el algoritmo patentado de Cellomics para generar un valor de intensidad nuclear y un valor de intensidad citoplasmática. Los resultados se informaron como la diferencia entre estos dos valores y se normalizaron aún más para controlar los datos que contenían células estimuladas al máximo y células tratadas con medio (POC).

45 [0198] En el segundo ensayo, se evaluó la capacidad de los anticuerpos para inhibir una señal proliferativa de IL-31 a través de OSMR en una línea celular estable que sobreexpresaba IL-31RA4 y OSMR humanos. Las células BaF3 se transfectaron de forma estable con dos plásmidos: pcDNA3.1 + huOSMRb (NeOR) y pcDNA3.1 + huIL31RA4 (ZeoR). En ausencia de IL-31 murina, esta línea celular sólo es capaz de proliferar en respuesta a la IL-31 humana y, por lo tanto, podría usarse para evaluar específicamente la capacidad de bloqueo de los anticuerpos anti-OSMR. Las células BaF3 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo. Se agregaron anticuerpos y ligando (hull-31, Peprotech) a los pocillos hasta un volumen final de 100  $\mu$ L y las placas se incubaron durante 72 horas en una cámara humidificada a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Despues de la incubación, se agregaron 20  $\mu$ l de Alamar Blue a cada pocillo y las placas se devolvieron a la incubadora. Las placas se leyeron en un lector de placas Molecular Devices Vmax (570-600 nm) en varios momentos posteriores a la adición de Alamar Blue.

55 [0199] Los resultados de los dos ensayos se presentan en la Tabla 3 a continuación. Se analizaron más de 3.000 sobrenadantes de hibridoma para determinar su capacidad de bloqueo en estos dos ensayos; Los 200 bloqueadores principales se probaron adicionalmente en una titulación de 4 puntos, y se eligieron 14 para la producción de proteína recombinante y pruebas adicionales. La  $IC_{50}$  para tres anticuerpos ejemplares (anticuerpos 1-3) se muestra para ambos ensayos. Algunos anticuerpos inhibieron la translocación de STAT3 inducida por OSM de manera más completa que la proliferación inducida por IL-31, y viceversa. Sin embargo, los tres anticuerpos eran potentes inhibidores de la señalización mediada por OSM e IL-31.

Tabla 3

Cl <sub>50</sub>	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	157 pM	252 pM	1,35 nM
IL-31	35,2 pM	27,6 pM	780 pM

EJEMPLO 3: Ensayos de bloqueo OSMR de Cynomolgus

**[0200]** La capacidad de los anticuerpos OSMR para bloquear la señalización a través de OSMR de cynomolgus se exploró utilizando dos ensayos con OSM humano o IL-31 humana como ligando.

**[0201]** En la primera selección, se evaluó la capacidad de los anticuerpos para bloquear la señalización de OSM a través de OSMR de cynomolgus mediante el uso de una línea celular epitelial primaria de riñón. La estimulación de estas células con OSM de cynomolgus (cyno) induce la fosforilación de STAT3 y su posterior translocación al núcleo. Las células se sembraron a razón de 3000 células por pocillo en placas Costar de 384 pocillos y se dejaron adherir durante la noche. Las células se trataron previamente con sobrenadantes de anticuerpos durante veinte minutos y luego se estimularon con cinco OSM 80 pM durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron 3 veces en PBS, se fijaron con una solución de formaldehído al 3,5 %, se lavaron (3 veces en PBST) y se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 al 0,5 %. A continuación, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-fosfoSTAT3 durante una hora, se lavaron y se tiñeron con un anticuerpo conjugado con AlexaFluor (todo contenido en el HitKit de Cellomics). Las placas se cubrieron y se leyeron en el instrumento ArrayScan utilizando el algoritmo patentado de Cellomics para generar un valor de intensidad nuclear y un valor de intensidad citoplasmática. Los resultados se informaron como la diferencia entre estos dos valores y se normalizaron aún más para controlar los datos que contenían células estimuladas al máximo y células tratadas con medio (POC).

**[0202]** En el segundo ensayo, se evaluó la capacidad de los anticuerpos para inhibir una señal proliferativa de IL-31 a través de OSMR de cinomolgo en una línea celular estable que sobreexpresaba IL-31RA y OSMR de cinomolgo. De manera similar al Ejemplo 2, se sembraron células BaF3 en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo. Se agregaron anticuerpos y ligando (cynomolgus IL-31, interno, es decir, Amgen, Seattle, WA) a los pocillos hasta un volumen final de 100 µL y las placas se incubaron durante 72 horas en una cámara humidificada a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Despues de la incubación, se agregaron 20 µL de Alamar Blue a cada pocillo y las placas se devolvieron a la incubadora. Las placas se leyeron en el lector de placas Vmax de Molecular Devices (570-600 nm) en varios momentos posteriores a la adición de Alamar Blue.

**[0203]** Los resultados de los dos ensayos se presentan en la Tabla 4 a continuación con la Cl<sub>50</sub> para cada anticuerpo mostrada para ambos ensayos. Los resultados confirmaron que cada uno de los anticuerpos 1, 2 y 3 son potentes inhibidores de la señalización mediada por OSM e IL-31.

Tabla 4

Cl <sub>50</sub>	Ab1	Ab2	Ab3
OSM	1,26 nM	518 pM	1,24 nM
IL-31	225 pM	29,3 pM	6,87 nM

EJEMPLO 4: Combinación de epítopos de anticuerpos anti-OSMR

**[0204]** Se realizaron estudios de competencia de anticuerpos para caracterizar los epítopos de los anticuerpos xenópticos anti-OSMR. Se puede considerar que los anticuerpos que compiten entre sí se unen al mismo sitio del objetivo. En estos experimentos, se capturaron OSMR o anticuerpos irrelevantes en perlas Luminex recubiertas de estreptavidina preunidas a un anticuerpo de captura (anticuerpo IgG Fc antihumano monovalente de ratón biotinilado). Se añadió antígeno OSMR o tampón (sin antígeno) a los pocillos, y se añadió una sonda de anticuerpo a cada pocillo y se detectó con un anticuerpo monovalente de ratón anti-IgG Fc humano marcado con PE. Se midió la intensidad de fluorescencia media de cada pocillo. Para una referencia completa, véase Jia et al., J. Immunol. Methods 288: 91-8, 2004. La detección de fluorescencia en un pocillo determinado indicó que el anticuerpo sonda pudo unirse a OSMR, incluso en presencia del otro anticuerpo OSMR, lo que demuestra que se unen a epítopos separados. Se encontraron un mínimo de tres recipientes como se muestra en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

Clasificación 1	Ab4
Clasificación 2	Ab1, Ab2, Ab3, Ab5, Ab6, Ab7, Ab8, Ab9, Ab10, Ab11, Ab12 y Ab13
Clasificación 3	Ab14

EJEMPLO 5: Determinación de la afinidad de anticuerpos anti-OSMR

5 [0205] Se determinaron las afinidades de los anticuerpos anti-OSMR. Se realizaron determinaciones de la constante de velocidad cinética para investigar la interacción de los anticuerpos 1-3 (Abs 1-3) con OSMR humano.

10 [0206] El análisis del biosensor se realizó a 25 °C en un sistema tampón HBS-EP+ (1X) (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3,0 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %) utilizando un biosensor óptico Biacore 3000 equipado con un chip sensor CM5. Todos los reactivos se mantuvieron a 8 °C antes de la inyección. Se inmovilizó IgG antihumana de cabra (Jackson ImmunoResearch, n.º 109-005-098) (~3000 RU) en el chip sensor mediante un acoplamiento de amina estándar a las células de flujo 1 y 2 y luego se bloqueó con etanolamina. hOSMR.FH se preparó en tampón de funcionamiento a 150 nM y se diluyó 3 veces hasta 0,617 nM. Los anticuerpos 1-3 se diluyeron (0,25 a 0,5 µg/ml) en tampón de proceso. Los anticuerpos se inyectaron (15 µL) sobre la célula de flujo 2 a un caudal de 10 µl/min. Se capturaron aproximadamente 50 RU de anticuerpo. Se dejó que la superficie se estabilizara (90 s) y luego se pasó cada concentración (150, 50, 0, 16, 7, 5, 5, 6, 1, 85 y 0,617) de hOSMR sobre las células de flujo 1 y 2 a un caudal de 50 µl/min para observar la asociación (5 min) y disociación (5 min). Las muestras se procesaron por duplicado y en orden aleatorio.

20 [0207] Se inyectaron blancos de analito de tampón (hOSMR 0 nM) antes, entre y después de las inyecciones de muestra. Se inyectaron anticuerpos (15 µl) sobre la célula de flujo 2 a un caudal de 10 µl/min. Se capturaron aproximadamente 50 RU de anticuerpo. Se dejó que la superficie se estabilizara (90 s) y luego cada concentración (150 nM) de hOSMR se pasó sobre las células de flujo 1 y 2 a un caudal de 50 µl/min para observar la asociación (5 min) y la disociación (1 -2 h). Las muestras se analizaron por triplicado.

25 [0208] Se inyectaron blancos de analito de tampón (hOSMR 0 nM) antes y después de las inyecciones de muestra. La superficie se regeneró a un caudal de 50 µL/min con dos inyecciones de glicina 10 mM (pH 1,5, 50 µL). A esto le siguió una inyección de tampón en blanco (15 s).

30 [0209] Los datos se analizaron con el software Scrubber 2.0 de la siguiente manera. Los datos de la célula de flujo 2 se restaron de los datos de la célula de flujo 1 (referencia en blanco). Los datos restados de referencia (2-1) luego se restaron (doble referencia) de los datos de concentración de 0 nM más cercanos. Los datos de disociación larga con doble referencia se ajustaron a un modelo de unión 1:1 para determinar la constante de velocidad de disociación (kd). Esta constante de tasa de disociación se usó como parámetro fijo para ajustar los datos de disociación corta con doble referencia a un modelo de unión 1:1 para determinar la constante de tasa de asociación (ka) y la constante de disociación de equilibrio (Kd).

35 [0210] Los reactivos se comportaron bien en las condiciones experimentales y los datos (consulte la Tabla 6 a continuación) se ajustan bastante bien a un modelo de unión 1:1.

40 **Tabla 6**

Anticuerpo	Antígeno	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_d$ (pM)
Ab1	huOSMR	4,47x10 <sup>5</sup>	9,95x10 <sup>-5</sup>	221
Ab2	huOSMR	5,50x10 <sup>5</sup>	1,81x10 <sup>-5</sup>	32,7
Ab3	huOSMR	9,47x10 <sup>4</sup>	1,02x10 <sup>-4</sup>	1080

EJEMPLO 6: Anticuerpos anti-OSMR

50 [0211] Se generaron anticuerpos completamente humanos dirigidos contra OSMR humano usando la tecnología XENOMOUSE® descrita anteriormente en el Ejemplo 1. Se demostró que cada uno de los anticuerpos 1, 2 y 3 eran inhibidores potentes de la señalización mediada por OSM y/o IL-31. Se determinaron las secuencias de los anticuerpos 1, 2 y 3 (es decir, Ab1, Ab2 y Ab3) y se exponen en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
Ab1- Nucleótido de cadena pesada	3	caggtcagtcgtggcagttctggggctgagggtgaagaaggcctgggc ctcaagtgaagggtctccctgcacaggcttctggatcacacccctcaccagg atgataatcaacttgggtgcacaggccacttggacagggtctgagggt atggatggatggatggaaaccttaatagtggtaacacagactatgcacagaa gttccaggcagactcaccatgaccaggaaacattccataaagcacgg cctacatggaggtgagcagccctgagatctgaggacacggcgtttat tacigtgcagagatatgggtgcgtgcgaaatacggattactacticta ctacggatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgttct cagctagcaccasaggccatcggtcttccccctggccctgtct aggacaccccccggagagcacagccggccctgggtgcctggtaaggaa ctacttcccccaaccgggtacgggtgtcggtggaaactcaggcgctctga ccaggcggcgtgcacacccctccagctgttctacgtbctcaggact tacitccctcagcaggtgggtgaccgtgcaccctccagcaacttccggc ccagaccciacacccctgcacacgttagatcacaaggccaggcaacaccaagg tggacaagacagggtggcgcacaaatgttgcgtcgatgtcccaccgtgc ccagcaccacccctgtggcaggacgttgcgttcttcccccacaa acccaaaggacacccctcatgtatctcccccgtggacccatccgg tgggtggggacgtggcgtggcgtggatggatggatggatggatggatgg tacgtggacccggcgtggggatggatggatggatggatggatggatgg ggagcagttcaacacgcacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt tgcaccaggactgggtgtggatggatggatggatggatggatggatgg acccaaaggacatcccccacccatcgagaaaaaccatctccaaaaccaa aggccagccccccggagaaaccacacgggtgtacacccctggccccc aggagaatggaccaagaaccacagggtcagccctgaccctgcctgg tttctacccccacccatcgccgtggatggatggatggatggatgg ggagaacaaactacaagaccacacccctccatgtggactccgacgg cccttcttcttctacagcaagctcaccgtggacaaaggcaggtgg caggggaaacgtttctcatgtctccgtgtatgcattggatggatgg ccactacacgcagaagagccctccctgttccggtaaa
Ab2- Nucleótido de cadena pesada	4	caggtcagtcgtggcagttctggggctgagggtgaagaaggcctgggc ctcaagtgaagggtctccctgcacaggcttctggatcacacccctcaccagg atgaaatcaacttgggtgcacaggccacttggacacagggttgcacagaa atggatggatggatggaaaccttaacatggatggatggatggatggatgg gttccaggcagactcaccatgaccaggaaacaccctccataaaggc cctacatggaaatggatggatggatggatggatggatggatggatggatgg tacigtgcagagatatgggtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc ttatggatggacgttggggccaaagggaccacggtgcaccgttct cagctagacccaaaggccatcggtttcccccctggccctgtct aggacccctcccgagagcacaggccctgggtgcctggatggatgg ctacitcccccacccatcggtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgt ccagcggcgtgcacacccctccatcggtgcgttgcgttgcgttgc tactccctcagcagcgtgggtgaccgtgcctccacgttccacttgg ccagacccatccctgcacagggttagatcacaaggccacggcaacaccaagg tggacaagacagggtggatggatggatggatggatggatggatgg ccagcaccacccctgtggcaggacccgttgcgttgcgttgcgttgc acccaaaggacacccctcatgtatctccggacccctggatggatgg tgggtggacgtggcgtggatggatggatggatggatggatggatgg tacgtggacccgggtggatggatggatggatggatggatggatgg ggagcagttcaacacgcacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc tgcaccaggactgggtgtggatggatggatggatggatggatgg acccaaaggacatcccccacccatcgagaaaaaccatctccaaaaccaa aggccagccccccggagaaaccacacgggttgcgttgcgttgcgt aggagatggaccaagaaccacagggtcagccctgaccctgg tttctacccccacccatcgccgtggatggatggatggatgg ggagaacaaactacaagaccacacccctccatgtggactccgacgg cccttcttcttctacagcaagctcaccgtggacaaaggcaggtgg caggggaaacgtttctcatgtctccgtgtatgcattggatgg ccactacacgcagaagagccctccctgttccggtaaa

(Continuación)

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
Ab3- Nucleótido de cadena pesada	5	cagggttcatctggtgcaagtctggagctgaggtgaagaaggctggggc ctcagtgaaggctctgtcaaggctctggttcacacctttaccagct atggtatcagtcgtgggtgcgcacaggccctggacaagggtttagtgg atggggatggctcaagcacttacagtgtaacacaaactatgcacagaa gttccaggggcagagtcaccatgaccacacatccaogagcacag ccatcatggagctgaggagctgagatctgacgacacacygcgggtat tacttgtcgagagggaaacttctactactacgtatggacgtctgggg ccaggggaccacggtcacggctctctcagctagoaccaaggccat cggttcctccctggcgcctgttcaggagcacccatccggagcaca gcggccctggctgttgtcaaggactacttccccgaaccgggtac ggtgtcggtgaactcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacccatcc cagctgttctacagtctcaggactactcccttccaycagcgggttgc acgtgcctccaggcaacttcggcacccagacatcacccatcgtcaacgt agatcacaaggccagcaacaccaagggtggacaagacagttgagcgc atgttgcgtcgagtgcgcacccgtgcccagcaccacccatgtggcagga ccgtcagtctcccttccctcccaaaacccaaaggacacccatcatgt ctcccgaggccctgagggtcactgtcgctgtgtggacgtgagccacg aagaccccgagggtccaggtaactgttacgtggacggcgtggagggt cataatgccaagacaaaggccacgggaggaggcaggttcasacgcacgtt ccgttgtgtcaggctctcaccgttgtgcaccaggactggctgaacg gaaaggagtacaaggtaaggcgtccaaacaaaggccatccagcccc atcgagaaaaaccatctccaaaaccaaggccaggccccgagaaccaca ggtgtacacccttgcoccccaatccggaggagtgaccacaaaccagg tcagcctgacttgcctgttcaaggcttcttcccttccatgcacgcac gtggagtggagagcaatggcagccggagaaacaaactacaagaccac accicccatgttgactccgcacggcttcttcttccatgcacgcac tcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggacgttcttcatgc tccgtgtatgatgaggcttgcacaaccactacacgcagaagacgc ctccctgtctccggtaaa
Ab1- Proteína de cadena pesada	6	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRNISISTAYIELSSLRSEDTAVY YCARDIVAAANTDYYFYYGMDVWQGQGTVTVSSASTKGPSVFLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYPFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDDHKPSNTKVDKTVERXCCVRCPPC PAPPVAGPSVFLFPPPKPKDTIIMLSRTPETVTVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVRNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPAPIEKTISKTKQGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKKG FYPSDLIAVEWESNGQFENNYKTTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ab2- Proteína de cadena pesada	7	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGYTGYAQKFQGRVTMTRNISISTAYMEMSSLRSEDTAVY YCARDIVAAANTDYYFYYGMDVWQGQGTVTVSSASTKGPSVFLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYPFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDDHKPSNTKVDKTVERXCCVRCPPC PAPPVAGPSVFLFPPPKPKDTIIMLSRTPETVTVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVRNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPAPIEKTISKTKQGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKKG FYPSDLIAVEWESNGQFENNYKTTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

(Continuación)

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
Ab3- Proteína de cadena pesada	8	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVKASGYTFTSYGISMWVRQAPGQGLEW MGWLSTYSGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMEIRSLRSDDTAVY YCARGNFYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPALAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV HNAXTKPREEQFNSTFRVVSILTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKQFREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQOPENNYKTTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Ab1 - Región variable de cadena pesada	9	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRNISISTAYIELSSLRSEDTAVY YCARDIVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSS
Ab2 - Región variable de cadena pesada	10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGTYGTYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMEMSSLRSEDTAVY YCARDIVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSS
Ab3 - Región variable de cadena pesada	11	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVKASGYTFTSYGISMWVRQAPGQGLEW MGWLSTYSGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMEIRSLRSDDTAVY YCARGNFYYYGMDVWGQGTTVTVSS
Ab1- Cadena pesada CDR1	12	SYDÍN
Ab2- Cadena pesada CDR1	13	SYEIN
Ab3- Cadena pesada CDR1	14	SYGIS
Ab1- Cadena pesada CDR2	15	WMNPNSGNTDYAQKFQG
Ab2- Cadena pesada CDR2	16	WMGWMNPNSGTYGTYAQKFQG
Ab3- Cadena pesada CDR2	17	WLSTYSGNTNYAQKLQG

(Continuación)

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
Ab1- Cadena pesada CDR3	18	DMVAANTDYYFYYGMDV
Ab2- Cadena pesada CDR3	19	DIVAANTDYYFYYGMDV
Ab3- Cadena pesada CDR3	20	GNFYYGMDV
Ab1- Nucleótido de cadena ligera	21	cagttctgtgtgtactcagccacccctcagcatctgggacccccgggca gagggttaccatctttgttcttggaaaggcaqctccaaacgttggaaagta atactgttaaggctggtaccacaaacagctccaggaaacggcccccaactc ctcatctataactaataatcggggccctccggggtccctgaccgatt ctctggctccaaagtctggcacccctcagctccctggccatcagtggc tccaggctgtgaggatgaggctgatttattttgttgcagcggttagatgac agtctgttaaggctggtatttcggggaggaccacactgaccgttcc aggccaaaccgaaaggccggccctcggttacttcgttccctccct ctgaggagcttcaagccaaacaaaggccacactgggtgttcaataagt gacttctaccggggagccgttgcacgttgccttggaaaggcagatagcag ccccgttcaaggccgggaggctggagaccacccctccaaacaaagca acaacaagttacccggccacgagcttatctgagcccttgcgttgc tggaaaggctccacacaagttacagcttgccttggccatgttgc caccgtggagaagacagtgttgccttgcatacagaatgttca
Ab2- Nucleótido de cadena ligera	22	cagttctgtgtgtactcagccacccctcagcatctgggacccccgggca gagggttaccatctttgttcttggaaaggcaactccaaacatgttggaaagta atactgttcaactgttaccacccatctggggcccttgcaccgatt ctctggctccaaagtctggctccctcagctccctggccatcagtggc tccaggctgtgaggatgaggctgatttattttactgttcaacatggatgac agctggatgttgcgttatttcggggaggaccacactgaccgttcc aggccaaaccgaaaggccggccctcggttacttcgttccctccct ctgaggagcttcaagccaaacaaaggccacactgggtgttcaataagt gacttctaccggggagccgttgcacgttgccttggaaaggcagatagcag ccccgttcaaggccgggaggctggagaccacccctccaaacaaagca acaacaagttacccggccacgagcttatctgagcccttgcgttgc tggaaaggctccacacaagttacagcttgccttggccatgttgc caccgtggagaagacagtgttgccttgcatacagaatgttca
Ab3- Nucleótido de cadena ligera	23	gaaattgtgttgcacgttccaggccaccctgtttttgttccagg ggaaaggagccaccccttccctgcaggggccagtcagatgttgcacgt gctacttagccctggtaccaggcagaaaactctggccaggttccaggct ctcatctttgttcttccaggccaccctggcatccctcagacaggtt caggccaggctgggtctggacagacttccatctcaccatcagcagac tggaggcttgcaggatgttgcactgttgcacgttgcgttgc tgcctcccgatcaccttcggccaggacacgactggagatataacg tacgggtggctgcaccatctgttcttccatcttccgcacatctgttgc atgttgcaggatcttgcactgttgcgttgc tacccatccaggccaaaggatcttgcacgttgcgttgc atccggtaactccaggaggtgttgcacagacaggacaggac qcacccatccgccttgcacgttgcaccctgcacgttgc gagaaaacacaaaggatcttgcacttgcgttgc ctgcctccgttcaacaaaggatcttgcacgttgc tgcggggagatgttgc

(Continuación)

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
Ab1- Proteína de cadena ligera	24	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNVGSNTVSWYQQLPGTAPKL LIYTNRRPSGVPDFSGSKSGTSASLAIISGLQSEDEADYFCALDD SLNGVVFGGGTKLTIVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEIQLQANKATLVCNIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSNSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Ab2- Proteína de cadena ligera	25	QSVLIQPPSASGTPGQRVTISCGSNNSNIGSNTVNWYHQLPGTAPKL LIYNINKRPSGVPDFSGSKSGSSASLAIISGLQSEDEADYFCSTWDD SLDGVVFGGGTKLTIVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEIQLQANKATLVCNIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSNSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
Ab3- Proteína de cadena ligera	26	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLPEPDFAVYYCQQYGS SPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNYF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Ab1- Variable de cadena ligera	27	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNVGSNTVSWYQQLPGTAPKL LIYTNRRPSGVPDFSGSKSGTSASLAIISGLQSEDEADYFCALDD SLNGVVFGGGTKLTIVLG
Ab2- Variable de cadena ligera	28	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNNSNIGSNTVNWYHQLPGTAPKL LIYNINKRPSGVPDFSGSKSGSSASLAIISGLQSEDEADYFCSTWDD SLDGVVFGGGTKLTIVLG
Ab3- Variable de cadena ligera	29	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLPEPDFAVYYCQQYGS SPPITFGQGTRLEIKR
Ab1- Cadena ligera CDR1	30	SGSSSNVGSNTVS
Ab2- Cadena ligera CDR1	31	SGSNSNIGSNTVN
Ab3- Cadena ligera CDR1	32	RASQSVSSSYLA
Ab1- Cadena ligera CDR2	33	TNRRPS
Ab2- Cadena ligera CDR2	34	NINKRPS
Ab3- Cadena ligera CDR2	35	GASSRAT

(Continuación)

	Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
5	Ab1 - Cadena ligera CDR3	36	AALDDSLNGW
10	Ab2 - Cadena ligera CDR3	37	STWDDSLDGW
15	Ab3 - Cadena ligera CDR3	38	QQYGSSPPIT

20 EJEMPLO 7: Anticuerpos anti-OSMR modificados

20 [0212] Se generaron versiones modificadas de Ab1, Ab2 y Ab3. Para las tres formas modificadas de los anticuerpos, se eliminó la lisina en el extremo C de la cadena pesada. Para Ab1 y Ab2, el sitio de glicosilación en la posición 73 se eliminó sustituyendo la asparagina en la posición 73 con ácido aspártico. Estas variantes se denominan Ab1-N73D y Ab2-N73D. Las secuencias de los anticuerpos modificados se exponen en la Tabla 8 siguiente (los nucleótidos y aminoácidos modificados están subrayados).

Tabla 8

	Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
30			
35			
40			
45			
50	Ab1 versión 2 - nucleótido de cadena pesada (N73D/lisina C-terminal eliminada)	47	caggtgcagctggcagtcgtggggctgaggtgaagaagcctgggc ctcagtgaaggcttcctgcaaggcttcggatacacccttcaccagtt atgatatactgggtgcacaggccactggacagggtttgagtgg atggatggatgaaccctaataatgtggtaacacagactatgcacagaa gttccaggccagagtcaccatgaccaggacatttcataaagcacgg cctacattgagctgagcgtggatgtggacacggccgtttat tactgtggagagatatggtggctgcataacggattactactata ctacggatggacgtctggggccaaagggaccacggtcaccgttcct cagctgacccaaggccatcggtttccccctggccctgtcc aggagccctccggagagacacagccggctggctgcgtggtaagga ctactccccggaaaccgggtgacgggtgtggaaactcaggcgctgt ccaggccgtgcacacattcccgatgttccatcaggccctcaggactc tactccctcaggccgtggacccgtgcctccaggcaacttcggc ccagacccaccccgcaacgttagatcacaagcccaagzaacaccaagg tgacaagacagttggacggccaaatgttgcgtggatgtcc ccaggccaccctggggcaggaccgtcagttccatccccccaaa acccaaggaaaccctcatgtatccggacccctggggatgtcc tgggtggacgtgagccacgaaagaccccgagggtccaggatcaactgg taatgtggacgggggtggagggtgcataatgcacaaaggccacggga ggaggcgttcaacacgacgttccgtgtggcagcgccctcaccgttg tgcaccaggactggctgaaacggcaaggagttacaatgtcaaggctc aacaaggccctcccgacccatcgagaaaaaccatctccaaaaccaa aggccaggccccgagaaccacagggtgtacaccctgcacccatccgg aggagatgaccaagaaccacagggttgcacccatggcgttggcaagg ttctaccctcaggccatcgccgtggagttggggagagcaatggcagcc ggagaacaactacaagaccacacccatgtggactccgacgggt cccttcctctacaggcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcag caggggaaacgttctcatgtctccgtgtatgcatgggtctgcacaa ccactacacgcaagaagagccctccctgtctccgggt
55			
60			
65			

(Continuación)

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
Ab2 versión 2 - nucleótido de cadena pesada (N73D/lisina C-terminal eliminada)	48	cagggtgcagctggggcagtcggggctgaggtaagaagaagcctggggc ctcaagtgaaggctctgcaggcttgcatacacccctcaccaggta atgaaaatcaactgggtgogacaggccactggacaaggcttgcgtgg atggatggatgaaccctaactgggttacacaggctatgcacagaa gttccaggggcagactcaccatgaccaggacacccctccataagcacag cctacatggaaatgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtat tactgtgogagagatatagtggctgcgaaatacggttactacttcta ttatggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctct cagctagcaccacggcccatcggtcttccctggcgtgtcaagga ctacttccccgaacccgtgacgggtgtggactcaggcgctgtga ccaggccgtgcacacccctccagctgtcctacagtctcaggactc tactccctcagcagcgtggtgcaccgtgcctccagcaacttggcac ccagacactacacccgtcaacgttagatcacaaggccacgcaacaccaagg tggacaagacagttgagcgcataatgttgcgtggactcaggcgctgtgc ccaggccacccctgtggcaggacccgtcagtttccctttccccccaaa acccaaaggacaccctcatgatctccggaccctgaggtacggtgcgc tgggtggacgtgagccacgaaagaccccgaggtcagttcaacttgg tacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaaggccacggga ggaggcagttcaacacgacacgttcgtgtggcaggttcctccaccgttg tgcaccaggactggctgaaaggcaaggagttacaagtgcaggtctcc aacaaggccatcccgaggccatcgagaaaaccatctccaaacc aggcagcccgagaaccacagggtgtacaccctgccccatcccg aggagatgaccaagaaccacagggtcagccgtgcctggtaaaaggc ttctaccctcagcgcacatccgtggagggtggagacatggcagcc ggagaacaactacaaggaccacacccatgtggactccgcacggct cccttcttcccttacagcaagctcaccgtggacaaggagcaggc caggggaaacgtcttcatgtccgtgtgcgtgatggcgttgcacaa ccactacacgcagaagacgcctccctgtctccgggt

(Continuación)

Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
Ab3: nucleótido de cadena pesada (lisina C-terminal eliminada)	49	caggittcatctggtgcagtctggagctgaggtgaagaaggcctggggc ctcagtgaaggctcttcgtcaaggcttcgggtacaccccttaccacgt atggatcagctgggtggcagaggccctgacaaaggcgtgagttgg atggatggctcagcacccatcagttggtaaacacaaaactatgcacacaa gtccaggcagactcaccatgaccacacatccacgagcaca ccatcatacggtgaggactgaggactcggatctgacgcacccggcgtgtat tactgtgcgagagggaaacttctactactacggatggacgtctgggg ccaggggaccacggtcaccgtctccctcagctacccatcggcaca cggtttcccccctggccgtgtccaggagcaccicccgagagcaca gcggccctggctgcctggtaaggacttcccccgaaccgggtgac ggtgtctggaaactcaggcgtctgaccagccgggtgcacacccctcc cagctgttccatcagtcctcaggactctactccctcggcagcgtgg accgtgcctccaggcaacttcggcaccacccagacatcacacccgtcaacgt agatcacaaggccaggcaacaccaaggtagacaagacagttgagc aatgttgtgtcgagtgcggccaccgtgtccaggcaccacccctcatgt ccgtcagtcttcctctccccccaaacccaaaggacacccctcatgt ctcccgaccctcagggtcacgtgcgtgtggacgtgagccac aagaccccgaggtccaggtaactggtaacgtggacggcgtggaggtg cataatggcaagacaaaggccacgggaggagcagttcaacacgcac ccgtgtggtcaggtccaccgtgtgcaccaggactggctgaa gcaaggagtacaagtgcaggcttcaacccaaaggccctccca atcgagaaaaccatctccaaaacccaaaggcagccccgagaacc ggtgtacaccctgcaccatccgggaggagatgacaaaggc tcagccgtgacctgcctgtcaaggcttccaccggcagcatcgcc gtggagtggagagcaatggcagccggagaacaactacaagg acccatgtggactccgacggcttcccttccatc tcaccgtggacaaggcagggtggcagcaggaaacgttctcatgc tccgtatgcattggcttcgacaaccactacacgcagaaggc ctccctgtctccgggt
Ab1 versión 2 - Proteína de cadena pesada (N73D/lisina C-terminal eliminada)	50	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTR <u>D</u> ISISTAYIELSSLRSEDTAVY YCARDMVAANTDYYFYGYMDVWGQGTIVTVSSASTKGPSVFFAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAPLQLQSSL YSLSVVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPC PAPPVAGPSVFLFPPKFKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESENQGPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
Ab2 versión 2 - Proteína de cadena pesada (N73D/lisina C-terminal eliminada)	51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGTYGQAQKFQGRVTMTR <u>D</u> TSISTAYMEMSSLRSEDTAVY YCARDIVAANTDYYFYGYMDVWGQGTIVTVSSASTKGPSVFFAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAPLQLQSSL YSLSVVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPC PAPPVAGPSVFLFPPKFKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESENQGPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

(Continuación)

5	Descripción	SEQ ID NO	Secuencia
10	Ab3 versión 2 - proteína de cadena pesada (lisina C-terminal eliminada)	52	QVHLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEW MGWLSTYSGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTAYMELRSLSDDTAVY YCARGNFYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDVFREPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDKPSNTKVDKTVVERKCCVECPCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVHQLNNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKQGPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESENQGPENNYKTPPMULDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVESC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
15	Ab1 versión 2 - Región variable de cadena pesada (N73D/lisina C-terminal eliminada)	53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGNTDYAQKFQGRVTMTRD <del>IS</del> ISTAYIELSSLRSEDTAVY YCAREMVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSS
20	Ab2 versión 2 - Región variable de cadena pesada (N73D/lisina C-terminal eliminada)	54	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYEINWVRQATGQGLEW MGWMNPNSGYTG <del>Y</del> AQKFQGRVTMTRD <del>TS</del> ISTAYMEMSSLRSEDTAVY YCARDIVAANTDYYFYYGMDVWGQGTTVTVSS

30 [0213] Los experimentos de ELISA se realizaron en varios formatos (ELISA de captura para el formato sin avidez; ELISA tipo sándwich para el formato en fase de solución; y ELISA directo para el formato con avidez en estado sólido) utilizando anticuerpos que contienen las regiones variables de Ab1 o Ab2 (o la variante N73D de Ab1 o Ab2) con diferentes regiones Fc.

35 [0214] Ab1 y Ab2 contienen cada uno dominios CH1, CH2, CH3 de origen IgG2 humano. Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "Ab1" y "Ab1 IgG2 WT" se refieren al mismo anticuerpo. De manera similar, los términos "Ab2" y "Ab2 IgG2 WT" se refieren al mismo anticuerpo.

40 [0215] Los anticuerpos identificados como "IgG4P agly/IgG1" contienen las regiones variables de Ab1 o Ab2 (o la variante N73D de Ab1 o Ab2) fusionadas al dominio CH 1 de la IgG4 humana, la bisagra de la IgG4 humana con una mutación de Ser a Pro (en posición 228) para reducir la mezcla, el dominio CH2 de IgG4 humana con una mutación de Asn a Gin (en la posición 297) para eliminar el sitio de glicosilación ligado a N, y el dominio CH<sub>3</sub> de IgG1 humana. El marco "IgG4P agly/IgG1" se describe en la solicitud de patente publicada en EE. UU. número US 2012/0100140.

45 [0216] Los resultados de ELISA indicaron que la eliminación de los sitios de glicosilación mediante la sustitución N73D no afectó la unión de los anticuerpos modificados a OSMR. Ver Tabla 9.

Tabla 9

50	Anticuerpo	Captura (CE50) nM	Sándwich (CE50) nM	Directo (CE50) nM
	<b>Ab1 IgG2 WT</b>	10,2	0,581	0,184
	<b>Ab1 N73D IgG2</b>	4,85	0,359	0,0728
	<b>Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1</b>	2,86	0,05	0,0626
55	<b>Ab2 IgG2 WT</b>	3,63	0,366	0,182
	<b>Ab2 N73D IgG2</b>	5,49	0,343	0,179
	<b>Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1</b>	1,61	0,064	0,0558

60 [0217] Los estudios de unión se realizaron utilizando el método BIACore. Los anticuerpos que contenían las regiones variables de Ab1 o Ab2 (o la variante N73D de Ab1 o Ab2) con diferentes regiones Fc se inmovilizaron en un chip CM4 (GE lifesciences) según los protocolos del fabricante. Se utilizó OSMR soluble como analito. La eliminación del sitio de glicosilación en Ab1 y Ab2 mediante la sustitución N73D mejoró las afinidades de unión. Para Ab1, la sustitución mejoró la tasa de Kon, mientras que para Ab2 mejoró la tasa de Koff. Ver Tabla 10.

Tabla 10

Anticuerpo	Kon (M-1s-1)	Koff (1/s)	KD (M)
Ab1 IgG2 WT	1,64E+05	1,50E-04	0,913E-9
Ab1 N73D IgG2	2,49E+05	1,68E-04	0,675E-9
Ab2 IgG2 peso	1,88E+05	1,89E-04	1,01E-09
Ab2 N73D IgG2	1,73E+05	4,99E-05	0,289E-9

[0218] La estabilidad de los fragmentos Fab se determinó evaluando el despliegue térmico de los anticuerpos. La alta temperatura de fusión de los fragmentos Fab se correlaciona directamente con una mayor estabilidad. La eliminación de los sitios de glicosilación en Ab2 mediante la sustitución N73D no afectó la estabilidad térmica de los fragmentos Fab y mostró efectos menores en Ab1, según lo evaluado mediante experimentos de fluorimetría de barrido diferencial. Ver Tabla 11.

Tabla 11

Anticuerpo	Fab Tm (Celsius)	Error estándar (Celsius)
Ab1 IgG2 WT	73,24	0,0097
Ab1 N73D IgG2	71,21	0,005
Ab1 N73D IgG4P agly / IgG1	74,23	0,014
Ab2 IgG2 peso	76,71	0,0096
Ab2 N73D IgG2	76,54	0,14
Ab2 N73D IgG4P agly / IgG1	76,69	0,018

[0219] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-OSMR modificados para bloquear la señalización a través de OSMR humano. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos modificados para inhibir la proliferación de una línea celular BaFhu-IL31R/OSMR/gp130 en presencia de IL31, OSM o IL31 y OSM. Los resultados se presentan en las Tablas 12 y 13 a continuación, mostrándose la  $IC_{50}$  para cada anticuerpo. Los resultados confirman que las versiones modificadas de Ab1 y Ab2 son potentes inhibidores de la señalización mediada por OSM e IL-31.

Tabla 12

Anticuerpo	IL31 ( $IC_{50}$ )	OSM ( $IC_{50}$ )	IL31/OSM ( $IC_{50}$ )
Ab2	0,3828	0,3528	-1,9
Ab1 IgG2 WT	0,6691	0,5298	4,004
Ab1 N73D IgG2	0,7565	0,5226	3,702
Ab1 N73D IgG4P Agly / IgG1	0,4672	0,5657	3,080

Tabla 13

Anticuerpo	IL31 ( $IC_{50}$ )	OSM ( $IC_{50}$ )	IL31/OSM ( $IC_{50}$ )
Ab2	0,4426	0,4019	1,8
Ab2 IgG2 WT	0,3671	0,4758	2,049
Ab2 N73D IgG2	0,2191	0,1859	1,474
Ab2 N73D IgG4P Agly / IgG1	0,2838	0,2401	1,276

## REIVINDICACIONES

- 5        1. Un anticuerpo de unión al receptor de oncostatina M (OSMR) para usar en un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la señalización mediada por OSMR, en donde la enfermedad o trastorno se selecciona de enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, en donde el anticuerpo anti-OSMR comprende:
- 10      (i) un dominio variable de cadena ligera que comprende una región 1 determinante de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR1) como se establece en SEQ ID NO:31, una región 2 determinante de la complementariedad de cadena ligera (LCDR2) como se establece en SEQ ID NO:34, y una región 3 determinante de la complementariedad de cadena ligera (LCDR3) como se establece en SEQ ID NO:37; y  
15      (ii) un dominio variable de cadena pesada que comprende una región 1 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR1) como se establece en la SEQ ID NO: 13, una región 2 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR2) como se establece en la SEQ ID NO: 16, y una región 3 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR3) como se establece en la SEQ ID NO: 19,
- 20      en el que el anticuerpo de unión a OSMR inhibe la unión de la oncostatina M humana (OSM) y la interleucina 31 humana (IL-31) a la OSMR humana y reduce la señalización mediada por OSM humana y IL-31 humana en células que expresan OSMR humana.
- 25      2. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a OSMR humano con una afinidad menor o igual a  $1 \times 10^{-10}$  M.
- 30      3. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que el anticuerpo se administra mediante administración parenteral.
- 35      4. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo se administra mediante inyección intravenosa o inyección subcutánea.
- 40      5. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo se administra en una dosis que oscila entre 0,1 µg/kg y 30 mg/kg.
- 45      6. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo se administra en una dosis que oscila entre 1,0 µg/kg y 20 mg/kg.
- 50      7. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según la reivindicación 5 o 6, en el que dicho anticuerpo se administra en una dosis que oscila entre 10 µg/kg y 10 mg/kg.
- 55      8. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo de unión anti-OSMR es un anticuerpo monoclonal.
- 60      9. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo de unión anti-OSMR está humanizado.
- 65      10. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo de unión anti-OSMR es un anticuerpo humano.
- 70      11. El anticuerpo de unión a OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-OSMR es un anticuerpo químérico.
- 75      12. El anticuerpo de unión anti-OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo de unión anti-OSMR es un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG4.
- 80      13. El anticuerpo de unión anti-OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al anticuerpo anti-OSMR se le han alterado o eliminado los sitios de glicosilación.
- 85      14. El anticuerpo de unión anti-OSMR para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:28 y el dominio variable de cadena pesada comprende el conjunto de secuencias de aminoácidos adelante en SEQ ID NO:54.