

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 869 970**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2016 PCT/IB2016/055336**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17042701**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2016 E 16766396 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 3347377**

54 Título: **Anticuerpos de unión a linfopoyetina estromal tímica (TSLP) y métodos de utilizar los anticuerpos**

30 Prioridad:

09.09.2015 US 201562216050 P

27.05.2016 US 201662342511 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.10.2021

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**RONDEAU, JEAN-MICHEL RENE;
EDWARDS, MATTHEW JOHN;
MILLER, DANFORTH;
HUANG, DANIEL;
HEMMIG, RENE;
KNOPE, HANS-PETER;
GUPTA, KAPIL;
VAN HEEKE, GINO ANSELMUS;
HAUBST, NICOLE y
ANDLAUER, BARBARA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 869 970 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de unión a linfopoyetina estromal tímica (TSLP) y métodos de utilizar los anticuerpos

5 Campo técnico

La presente invención proporciona Fabs, que se unen específicamente a linfopoyetina estromal tímica (TSLP), composiciones y kits que comprenden estos Fabs, usos de estos Fabs como un medicamento y métodos para producir estos Fabs.

10

Antecedentes

La linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es una citoquina que envía señales a través de un receptor heterodimérico que consiste en la subunidad IL-7R α y TSLP-R, un componente único con homología con la cadena similar al receptor y común (Pandey et al., Nat Immunol. 2000, 1(1):59-64). La TSLP se expresa en células epiteliales del timo, pulmón, piel, intestino y amígdalas, así como en las células del músculo liso de las vías respiratorias, fibroblastos pulmonares y células estromales (Edwards, 2008, Drug news & perspectives 21, 312-316; He y Geha, 2010, Annals of the New York Academy of Sciences 1183, 13-24; Reche et al., 2001, Journal of immunology 167, 336-343). Estas células producen TSLP en respuesta a estímulos proinflamatorios, y la TSLP impulsa respuestas inflamatorias alérgicas a través de su actividad en un cierto número de células inmunes innatas, incluyendo las células dendríticas (Soumelis et al., 2002, Nature immunology 3, 673-680), monocitos (Reche et al., 2001, Journal of immunology 167, 336-343), y mastocitos (Allakhverdi et al., 2007, The Journal of Experimental Medicine 204, 253-258). Las poblaciones de células con la expresión más alta conocida tanto de TSLP-R como de IL-7R α son células dendríticas mieloides (Reche et al., 2001, Journal of immunology 167, 336-343).

25

La TSLP puede fomentar la proliferación de células T naífs e impulsar su diferenciación en células Th2 que expresan altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 (Omori y Ziegler, 2007, Journal of immunology 178, 1396-1404). Se ha encontrado un alto nivel de expresión de la TSLP en células epiteliales pulmonares asmáticas y lesiones de dermatitis atópica crónica, lo que sugiere un papel de la TSLP en la inflamación alérgica (Ziegler y Artis, 2010, Nature immunology 11, 289-293). Una evidencia más reciente implica a la TSLP en la diferenciación de células Th17 y procesos inflamatorios impulsados por Th17 (Hartgring et al., 2011, Arthritis and rheumatism 63, 1878-1887; Tanaka et al., 2009, Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 39, 89-100; Wu et al., 2014, Journal of molecular and cellular cardiology 76, 33-45). El asma alérgico crónico (atópico) se caracteriza a menudo por una inflamación de tipo Th2, mientras que la inflamación asmática no alérgica es predominantemente neutrofílica con un medio mixto de citoquinas Th1 y Th17. Las consecuencias de la inflamación crónica en el asma incluyen hiperreactividad bronquial (BHR), sobreproducción de moco, remodelación de la pared de las vías respiratorias y estrechamiento de las vías respiratorias (Lambrecht y Hammad, 2014, Nature immunology 16, 45-56). Se demostró que la TSLP está implicada en el inicio y mantenimiento/potenciamiento de la respuesta asmática alérgica (Wang et al., 2006, Immunity 24, 827-838). Más recientemente, también se descubrió que la señalización de TSLP era necesaria para la respuesta de recuerdo de las células T de memoria a la exposición al antígeno local (Wang et al., 2015, The Journal of allergy and clinical immunology 135, 781-791 e783).

30

El documento WO2011/056772 describió la generación de anticuerpos humanizados derivados del anticuerpo de rata 23B13, «Anticuerpo 4» (Ejemplo 3, página 38). El documento WO2007/096149 describe la generación de anticuerpos contra la proteína TSLP humana con la colección de presentación en fagos Morphosys HuCAL GOLD. El documento WO2007/112146 describe anticuerpos que reconocen y antagonizan específicamente el receptor de TSLP humano.

45

Gauvreau Gail et al. ("Effects of an anti-TSLP antibody on allergen-induced asthmatic responses", NEJM, Vol. 370, n° 22, 29 de mayo de 2014, págs. 2102-2110) investiga los efectos de AMG157, una inmunoglobulina G2 λ monoclonal anti-TSLP humana, sobre respuestas asmáticas inducidas por alérgenos.

50

Sumario de la invención

En un aspecto, en esta memoria se proporcionan moléculas como se definen en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. La molécula de la invención proporcionada en esta memoria es un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) humana, seleccionado de una cualquiera de los siguientes:

55

a) un fragmento de anticuerpo que comprende:

una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

60

una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

5 una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en donde las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se definen de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat,

y en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab;

10 b) un fragmento de anticuerpo que comprende:

una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

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

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

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

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

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

en donde las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se definen de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia,

y en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab;

20 c) un fragmento de anticuerpo que comprende

una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

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

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

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

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

una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13,

en donde las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se definen de acuerdo con la combinación de los esquemas de numeración de Chothia y Kabat;

y en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab.

30

En algunas realizaciones específicas, la molécula comprende un fragmento de anticuerpo que se une a TSLP humana y comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab. En otras realizaciones específicas, la molécula comprende un fragmento de anticuerpo que se une a TSLP humana y comprende una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab.

40

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

45

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

50

Las moléculas de unión a TSLP de la invención son Fabs, p. ej., Fabs humanos o humanizados, que se unen específicamente a TSLP humana.

55

En algunas realizaciones, las moléculas descritas en esta memoria se unen a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 100 pM. En algunas realizaciones, las moléculas descritas en esta memoria se unen a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 10 pM.

60

En otro aspecto, en esta memoria se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprende al menos una molécula de unión a TSLP tal como se define en la reivindicación 1 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la relación en masa de excipiente:molécula de unión a TSLP es mayor que 0,5. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TSLP es aproximadamente 5% a aproximadamente 95%, o aproximadamente 10% a aproximadamente 90%, o aproximadamente 15% a aproximadamente 85%, o aproximadamente 20% a

aproximadamente 80%, o aproximadamente 25% a aproximadamente 75%, o aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, o aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, o aproximadamente 40-50% (p/p) de la composición farmacéutica. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un agente formador de envoltura, tal como trileucina o leucina. En algunas realizaciones, la trileucina o leucina es aproximadamente el 10-75 % (p/p) de la composición. En algunas realizaciones, la trileucina es aproximadamente 10-30% (p/p) de la composición. En otras realizaciones, la leucina es aproximadamente 50-75% (p/p) de la composición. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un excipiente formador de vidrio, en donde el excipiente formador de vidrio se selecciona de histidina, trehalosa, manitol, sacarosa o citrato de sodio. En algunas realizaciones, al menos un excipiente formador de vidrio es trehalosa o una mezcla de trehalosa y manitol. En algunas realizaciones, el excipiente formador de vidrio es aproximadamente 15-35% (p/p) de la composición. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un tampón, tal como un tampón histidina, glicina, acetato o fosfato. En algunas realizaciones, el tampón es aproximadamente 5-13% de la composición.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria se formulan como una formulación de polvo seco, p. ej., una formulación de polvo seco adecuada para inhalación.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria comprenden partículas secadas por pulverización que comprenden una envoltura y un núcleo, en donde la envoltura comprende trileucina o leucina, y el núcleo comprende: (i) la molécula de unión a TSLP según se define en la reivindicación 1, trehalosa, manitol y un tampón; o (ii) la molécula de unión a TSLP tal como se define en la reivindicación 1, trehalosa, tampón y HCl. El tampón puede ser un tampón de histidina, glicina, acetato o fosfato.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria comprenden partículas secadas por pulverización que comprenden: (i) una envoltura que comprende trileucina o leucina ; y (ii) un núcleo que comprende trehalosa, manitol, histidina y una molécula de unión a TSLP, o un núcleo que comprende trehalosa, histidina, HCl y una molécula de unión a TSLP, en donde la molécula de unión a TSLP es un fragmento Fab de anticuerpo que comprende: o (a) una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; o (b) una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o (c) una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria comprenden:
 (a) 40% (p/p) de fragmento de anticuerpo de unión a TSLP, 25% (p/p) de trileucina, 30% (p/p) en peso combinado de trehalosa y manitol, y 5% (p/p) de histidina;
 b) 50% (p/p) de fragmento de anticuerpo de unión a TSLP, 15% (p/p) de trileucina, 2,6% (p/p) de HCl, 5,6% (p/p) de histidina y 26,8% (p/p) en peso combinado de trehalosa y una base; o
 c) 50% (p/p) de fragmento de anticuerpo de unión a TSLP, 15% (p/p) de trileucina, 19,4% (p/p) de trehalosa, 13,04% (p/p) de histidina y 2,56% (p/p) de HCl.

También se proporcionan en esta memoria ácidos nucleicos que codifican cualquier molécula de unión a TSLP descrita en esta memoria, vectores que comprenden ácidos nucleicos de este tipo y células huésped que comprenden el ácido nucleico o el vector.

También se proporcionan métodos para producir la molécula de unión a TSLP descrita en esta memoria. Métodos de este tipo pueden incluir (a) cultivar una célula huésped que exprese un ácido nucleico que codifica la molécula; y (b) recoger la molécula del medio de cultivo.

En otro aspecto, en esta memoria se proporcionan kits que comprenden al menos una molécula de unión a TSLP o composición farmacéutica descrita en esta memoria, y un dispositivo para suministrar la molécula o composición farmacéutica a un sujeto. En algunas realizaciones, el dispositivo puede suministrar la molécula o composición farmacéutica en forma de un aerosol. En algunas realizaciones, el dispositivo es un inhalador de polvo seco.

En otro aspecto, en esta memoria se proporcionan moléculas de unión a TSLP tal como se define en las reivindicaciones adjuntas o composiciones farmacéuticas tal como se describen en esta memoria para uso como un medicamento. También se incluye el uso de las moléculas de unión a TSLP o la composición farmacéutica descrita en esta memoria

para tratar una afección relacionada con TSLP en un sujeto en necesidad del mismo. La presente divulgación también incluye el uso de la molécula descrita en esta memoria en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de una afección relacionada con la TSLP en un sujeto en necesidad del mismo.

La afección inflamatoria relacionada con la TSLP puede ser una cualquiera de asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rinitis alérgica, rinosinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, esofagitis eosinofílica o dermatitis atópica. En algunas realizaciones, la afección inflamatoria relacionada con TSLP es el asma. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TSLP se formula como una formulación de polvo seco adecuada para la inhalación. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TSLP se administra al sujeto por vía oral o intranasal, p.ej., en forma de un aerosol. En algunas realizaciones, la molécula de unión a TSLP se administra al sujeto mediante un inhalador de polvo seco.

En algunas realizaciones, los usos de la molécula de unión a TSLP incluyen, además, la administración de un segundo agente al sujeto que necesita tratamiento. El segundo agente puede ser un corticosteroide, un broncodilatador, un antihistamínico, un antileucotrienos o un inhibidor de PDE-4.

En otro aspecto, en esta memoria se proporcionan métodos para preparar una formulación de polvo seco que comprende la molécula de unión a TSLP descrita en esta memoria. Métodos de este tipo pueden incluir una o más de las siguientes etapas: (a) proporcionar una solución acuosa que comprende una molécula de unión a TSLP tal como se describe en esta memoria, trileucina o leucina, un excipiente formador de vidrio y un tampón; (b) secar por pulverización la solución acuosa de la etapa (a) a una temperatura en el intervalo entre aproximadamente 120°C y aproximadamente 200°C (entrada) y entre 55°C y aproximadamente 75°C (salida) para producir partículas de polvo seco; y (c) recoger las partículas de polvo seco. En algunas realizaciones, el tampón se selecciona de un tampón histidina, glicina, acetato o fosfato. En algunas realizaciones, el excipiente formador de vidrio se selecciona de histidina, histidina HCl, trehalosa, manitol, sacarosa o citrato de sodio.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se recogen en los dibujos adjuntos y la descripción que figura a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1A muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Fab1 de TSLP anti-humano (SEQ ID NO: 22) con las CDR subrayadas (según se define por Kabat), y los residuos situados en la interfaz de anticuerpo-antígeno marcado con *. FIG. 1B muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Fab1 de TSLP anti-humano (SEQ ID NO: 25) con las CDR subrayadas (según se define por Kabat), y los residuos situados en la interfaz de anticuerpo-antígeno marcado con *.

FIG. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la TSLP humana recombinante utilizada en estudios de cristalografía (SEQ ID NO: 38), con los elementos de la estructura secundaria mostrados debajo de la secuencia de aminoácidos. Los recuadros representan hélices α_A , α_B , α_C y α_D y las líneas gruesas representan las regiones de bucle. La TSLP humana madura comienza en Tyr29. La construcción utilizada aquí tenía una etiqueta de hexahistidina N-terminal (residuos 15-20) seguida de un sitio de reconocimiento de proteasa HRV-3C (PreScission) (residuos 21-28) y residuos 11-14 resultantes de la clonación. Asn64 y Asn119 son sitios potenciales de glicosilación enlazados a N; y los residuos 127-130 constituyen el sitio de escisión de furina.

FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra el efecto de la neutralización de TSLP sobre la inflamación pulmonar en ratones sensibilizados con ovoalbúmina que fueron enfrentados a antígeno. Los ratones sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) o solución salina más alumbre recibieron una administración intravenosa de TSLP antimurina o anticuerpo de control de isotipo 1 h antes de las sensibilizaciones. Todos los ratones fueron enfrentados a OVA el día 21 y se sacrificaron a las 24 h. Los valores representan la media $\pm$ EMT (Error Medio Típico) total y recuentos de células diferenciales dentro de BAL. El análisis estadístico se realizó utilizando un test T de Student no pareado. Las diferencias significativas entre ratones sensibilizados con solución salina tratados con isotipo y ratones sensibilizados con OVA en $p < 0,05$ se indican con (*) y $p < 0,01$ con (**). Las diferencias entre ratones sensibilizados con OVA tratados con isotipo y con anticuerpo anti-TSLP a $p < 0,05$ se indican mediante (#). [PMN: células polimorfonucleares (neutrófilos); Eos: eosinófilos; MO: monocitos; Linf.: linfocitos; TCC: recuento total de células.]

Las FIGs. 4A-4C son una serie de gráficos de barras que demuestran que la neutralización de TSLP atenúa significativamente los niveles de IL-13 (FIG. 4A), eotaxina-2 (CCL24, FIG. 4B) y quimioquina regulada por el timo y por activación (TARC, CCL17, FIG. 4C) dentro del pulmón de ratones enfrentados a antígenos, sensibilizados con ovoalbúmina. Los ratones sensibilizados con OVA (o solución salina) más alumbre recibieron una administración intravenosa de anticuerpo TSLP anti-murino o de control de isotipo 1 h antes de las sensibilizaciones. Todos los ratones fueron enfrentados a OVA el día 21 y se sacrificaron a las 24 h. Los valores representan la media $\pm$ EMT de los niveles de mediadores en el BAL, medidos por ELISA específico. El análisis estadístico se realizó utilizando un test T de Student no pareado. Las diferencias significativas entre ratones sensibilizados con solución salina tratados con isotipo y ratones

sensibilizados con OVA a $p < 0,05$ se indican con (*) y $p < 0,01$ con (**). Las diferencias entre ratones sensibilizados con OVA tratados con isotipo y con anticuerpo anti-TSLP a $p < 0,05$ se indican mediante (#).

FIG. 5 es un gráfico de líneas que muestra los perfiles de concentración sérica media-tiempo de Fab1 anti-TSLP total en monos.

Las FIGs. 6A y 6B son gráficos de barras que muestran las concentraciones medias de Fab1 anti-TSLP total en BAL (6 A) u homogeneizado de pulmón (6 B) en monos en 1 h (grupos de inhalación de 1, 10, 20 mg/kg/día) o 6 días (grupos de inhalación de 1 mg/kg IV + 20 mg/kg/día) después de la última dosis inhalada.

FIG. 7 ilustra una visión general de TSLP humana en complejo con Fab1 anti-TSLP. Las hélices de TSLP se marcaron A a D desde el extremo N al extremo C.

FIG. 8 muestra el epítipo de TSLP fijado como objetivo por Fab1 anti-TSLP. La parte superior de la figura muestra el número de contactos intermoleculares directos entre átomos que no son de hidrógeno dentro de una distancia de 4,0 Å, y la parte inferior muestra la reducción en la superficie accesible al disolvente tras la formación del complejo. La secuencia de aminoácidos de la TSLP se muestra en el eje horizontal.

FIG. 9 muestra la vista de anticuerpos del epítipo de TSLP. TSLP se muestra en una representación de caricaturas tipo cinta. Todos los residuos de aminoácidos implicados en los contactos directos con los Fab1 (corte a una distancia de 4,0 Å) se muestran en la representación de barras y esferas.

Las FIGs. 10A y 10B muestran el parátipo de cadena pesada (A) y de cadena ligera (B) de Fab1 anti-TSLP. La parte superior de la figura muestra el número de contactos intermoleculares directos ($\leq 4,0$ Å) entre átomos que no son de hidrógeno, la parte inferior muestra la reducción en la superficie accesible al disolvente tras la formación del complejo. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada o ligera se muestra en el eje horizontal.

Las FIGs. 11A-11C muestran el modo de acción de Fab1 anti-TSLP. FIG. 11A es una vista del complejo de señalización extracelular de ratón, con IL-7R α en negro y TSLPR en gris claro. FIG. 11B es una vista del complejo TSLP-Fab 1 humano en la misma orientación que la FIG. FIG. 11C es la superposición estructural de los dos complejos, basada en los átomos de citoquina C α . El complejo de señalización de ratón está en gris claro, el complejo TSLP-Fab1 humano está en negro.

FIG. 12 es un diagrama de dispersión que ilustra que las formulaciones en relaciones altas de excipiente:proteínas mejoran la estabilidad físico-química de Fab1 anti-TSLP, tal como se muestra por la reducción en la tasa de agregación de proteínas.

Descripción detallada

Definiciones

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la forma en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una célula" incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

Todas las designaciones numéricas, p. ej., pH, temperatura, tiempo, concentración y peso molecular, incluidos los intervalos, son aproximaciones que se varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Se ha de entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas van precedidas por el término "aproximadamente". También se ha de entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en esta memoria son meramente ejemplos y que equivalentes de los mismos son conocidos en la técnica.

Tal como se utiliza en esta memoria, "TSLP" (también conocida como "linfopoyetina estromal tímica") se refiere a una citoquina producida por células no hematopoyéticas en respuesta a estímulos proinflamatorios. El gen TSLP humano está mapeado en la ubicación cromosómica 5q22.1, y la secuencia genómica del gen TSLP se puede encontrar en GenBank en NC_000005.10. Debido al corte y empalme alternativo, dos isoformas de TSLP están presentes en el ser humano. Las secuencias de proteína y ARNm para las dos isoformas de TSLP humana se enumeran en la Tabla 1.

TABLA 1. Secuencias de aminoácidos y de ARNm de TSLP

Espece	Isoforma	Nº Acceso a GeneBank	Secuencia
Homo sapiens	Aminoácido de la isoforma 1 de TSLP	NP_149024.1	MFPPALLYVLSVSFRKIFILQLVGLVLTIDFTNC DFEKIKAAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVS CSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMK TKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRRKRKVT TNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 27)
Homo sapiens	ARNm de la isoforma 1 de TSLP	NM_033035.4	GCAGCCAGAA AGCTCTGGAG CATCAGGGAG ACTCCAACCTT AAGGCAACAG CATGGGTGAA TAAGGGCTTC CTGTGGACTG GCAATGAGAG GCAAAACCTG GTGCTTGAGC ACTGGCCCCCT AAGGCAGGCC TTACAGATCT CTTACACTCG TGGTGGGAAG AGTTTAGTGT GAAACTGGGG TGGAATTGGG TGTCCACGTA TGTTCCTTT TGCCTTACTA TATGTTCTGT CAGTTTCTTT CAGGAAAATC TTCATCTTAC AACTTGTAGG GCTGGTGTTA ACTTACGACT TCACTAACTG TGACTTTGAG AAGATTAAAG CAGCCTATCT CAGTACTATT TCTAAAGACC TGATTACATA TATGAGTGGG ACCAAAAGTA CCGAGTTCAA CAACACCGTC TCTTGAGCA ATCGGCCACA TTGCCTTACT GAAATCCAGA GCCTAACCTT CAATCCCACC GCCGGCTGCG CGTCGCTCGC CAAAGAAATG TTCGCCATGA AAATAAGGC TGCCTTAGCT ATCTGGTGCC CAGGCTATTC GGAAACTCAG ATAAATGCTA CTCAGGCAAT GAAGAAGAGG AGAAAAAGGA AAGTCACAAC CAATAAATGT CTGGAACAAG TGTCACAATT ACAAGGATTG TGGCGTCGCT TCAATCGACC TTTACTGAAA CAACAGTAAA CCATCTTTAT TATGGTCATA TTTCACAGCA CCAAAATAAA TCATCTTTAT TAAGTAGATG AAACATTAAC TCTAACTGTG ACAAAGAAGA CCACAAATAG

			TTATCTTTTA ATTACAGAAG AGTTTCTTAA CTTACTTTTG TAAGTTTTTA TTGTGTAAGT TTATAATGCA GGGGAAGTAC TACTCCTCAA ATGTTGAGGG AAGCTTCCAT AACATTGATG ACTGGCTTCA TGGCAGTAAT TCTCGGCTGT AGTTGCATAA GCATTGCTCA AGAGGAAAAT CCAAAAGTGC AGCAGGAGAA CTCTTTTCCC TGAAAAAGGA AAAATATTGA ACTCAATGAT AGCACCTAAA CTTACATTTA AAAGACAGAC ATTCTTCTA CATGTAATGA CACTTCTTGT GTTAAACTAA AAATTTACAA GAGAAGAAAAG TGAAAGCAAA TGGGGTTTCA CAAATAGTTG TAAATATAGT GAAGCAATTT GAAATAATTT TCAAGCAAAG TATTGTGAAA GTATTCTAAG CCAAGTTTAA AATATTATCT AACAGACAAG AGTGGTATAT ACAAGTAGAT CCTGAGAAGT ACCTTTGTGA CAGCTACTAT AAATATACAT ATAAATTATA GAATCTACTT TAATTTATTT TGTGAACACT TTTGAAAATG TACATGTTCC TTTGTAAATTG AACTATATA TTCTTAATA AAATAATTCT CAAATTTGTT TCTTATGAAT CATCTCTCAA ATCTAGTTAG ACAATTTGCA CACATACTTT TCTAAGGGAC ATTATCTTCC TTCAGGTTTT TACCTCCACT CATCCTTAGA GCCCCTGAC TGCTCCCTT TATACCTGTT GGCCCTGCCT ATAGGAGAGA ATATTTGGAG ATAGGCAGCT TCAGGATGCA TTGCAATCAT CCTTTTCTTA AATTATGTCA CTAGTCTTTT ATTTTTTCCC CTCTTGAAC TCTCTCACAC CTGGAAGAAA CAAAGTAGGA AAAAGTGAAC AGGGGATGTC AAATCGATT TGAATTCCC GCTGCAAGCT AGAGCCGAG GCACCCTCTC ACTCAATTTC CACTCAGAAC CCTATAAACA CCAGTGGGAA GGGCAACCCA CTGCACGTGG GAATGCACTG ATTTTTCTTA GGAGTAGACA TGTTCTCTA ATTACTCCCT GAGGGTAGT TGGGGCTAAA CCATGACAGA AGTGGGGAAG TTCAATGTCC TTAAATCCAT CTTACTTGCC AACAGGTAAG AGGAAGCTTA CATTACATGT CCAGTCCACA TTAAAGAGC ACTTACTGTG GAACAAGCCT TCAGCCAAAC AATGGGGATA GAAAAGTAGG TAAGACTCAG CCTTTGTCCA GAGAAGCTCA GGGTATAGCT GAATAGGCAG TTTCTTTTGT CCTGAGGAAA ATCAGGACAT GCCTGCTTTC TAAAAATCTT CCTCTGAAGA CCTGACCCAA GCTCTTAAAT GCTATTGTAA GAGAAATTTC TTTGTCTATT AACTCCATTT TAGTAGGGAT TCACTGACTA GATTTTACTG AACTATGAAA ATAAATACAC ATAATTTTTT ACAAAATTTT GGGCCCAATT CCCCTAAAAG AATTGAGGAT TAGGGAGAAA GGAGACAAC CAAAGTCATC CCATTAAGTG CAGTTTCTTT GAATCTTCTG CTTTATCTTT AAAAATTTGT ATAATTATA TATTTTATTC TATGTGTTCC ATAGATATCT TAATGTAAAA TTAGTCATT AAATTACACT GTCAATTAAA AGTAATGGGC AAGAGATTGC ATCATACTAA TTTAGTAAGA ACGTTCCCAA ATGTTGTAAC AATGTGGATC ATACATCTCT GGTTTTTTAA ATGTATTGAG GCTTTCTTGG TGGACTAGTA TAGTATACGG TCAGTTATGT CAATGTTTCA TGGTCAATAA AAAGGAAGTT GCAAATTGT (SEQ ID NO: 28)
Homo sapiens	Aminoácido de la isoforma 2 de TSLP	NP_612561.2	MFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRR KRKVTNKCLEQVSQLQLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 29)

Homo sapiens	ARNm de la isoforma 2 de TSLP	NM_138551.4	ACCCTCGCCA CGCCCCTGCT CCCCCGCGGT TGGTTCTTCC TTGCTCTACT CAACCCTGAC CTCTTCTCTC TGACTCTCGA CTTGTGTTCC CCGCTCCTCC CTGACCTTCC TCCCCTCCCC TTCACTCAA TTCTCACCAA CTCTTTCTCT CTCTGGTGTT TTCTCCTTTT CTCGTAAACT TTGCCGCCTA TGAGCAGCCA CATTGCCTTA CTGAAATCCA GAGCCTAACC TTCAATCCCA CCGCCGGCTG CGCGTCGCTC GCCAAAGAAA TGTTCGCCAT GAAAACATAAG GCTGCCTTAG CTATCTGGTG CCCAGGCTAT TCGGAAACTC AGATAAATGC TACTCAGGCA ATGAAGAAGA GGAGAAAAAG GAAAGTCACA ACCAATAAAT GTCTGGAACA AGTGTCACAA TTACAAGGAT TGTGGCGTCG CTTCAATCGA CCTTTACTGA AACAAACAGTA AACCATCTTT ATTATGGTCA TATTTACAG CACCAAATA AATCATCTTT ATTAAGTAGA TGAAACATTA ACTCTAACTG TGACAAAGAA GACCACAAAT AGTTATCTTT TAATTACAGA AGAGTTTCTT AACTTACTTT TGTAAGTTTT TATTGTGTAA GTTTATAATG CAGGGGAAGT ACTACTCCTC AAATGTTGAG GGAAGCTTCC ATAACATTGA TGACTGGCTT CATGGCAGTA ATTCTCGGCT GTAGTTGCAT AAGCATTGCT CAAGAGGAAA ATCCAAAAGT GCAGCAGGAG AACTCTTTTC CCTGAAAAAG GAAAAATATT GAACTCAATG ATAGCACCTA AACTTACATT TAAAAGACAG ACATTCCTTC TACATGTAAT GACACTTCTT GTGTTAAACT AAAAAATTAC AAGAGAAGAA AGTGAAAGCA AATGGGGTTT CACAAATAGT TGTAATATA GTGAAGCAAT TTGAAATAAT TTTCAAGCAA AGTATTGTGA AAGTATTCTA AGCCAAGTTT TAAATATTAT CTAACAGACA AGAGTGGTAT ATACAAGTAG ATCCTGAGAA GTACCTTTGT TACAGCTACT ATAAATATAC ATATAAATTA TAGAATCTAC TTTAATTTAT TTTGTGAACA CTTTGA AAAA TGTACATGTT CCTTTGTAAT TGACACTATA TATTTCTTAA TAAAAAATT CTCAAATTTG TTTCTTATGA ATCATCTCTC AAATCTAGTT AGACAATTTG CACACATACT TTTCTAAGGG ACATTATCTT CCTTCAGGTT TTTACCTCCA CTCATCCTTA GAGCCCACTG ACTGCTCCCC TTTATACCTG TTGGCCCTGC
--------------	-------------------------------	-------------	--

			CTATAGGAGA GAATATTTGG AGATAGGCAG CTTCAGGATG CATTGCAATC ATCCTTTTCT TAAATTATGT CACTAGTCTT TTATTTTTTC CCCTCTTGAA CTTTCCTCAC ACCTGGAAGA AACAAAGTAG GAAAAAGTGA ACAGGGGATG TCAAATCGAT TCTTGAATTC CCGCTGCAAG CTAGAGCCGC AGGCACCCTC TCACTCAATT TCCACTCAGA ACCCTATAAA CACCAGTGGG AAGGGCAACC CACTGCACGT GGGAATGCAC TGATTTTTTC TAGGAGTAGA CATGTTCTC TAATTACTCC CTGAGGGTTA GTGGGGCTA AACCATGACA GAAGTGGGGA AGTTCAATGT CCTTAAATCC ATCTTACTTG CCAACAGGTA AGAGGAAGCT TACATTACAT GTCCAGTCCA CATTTAAAGA GCACTTACTG TGGAACAAGC CTTCAGCCAA ACAATGGGGA TAGAAAAGTA GGTAAGACTC AGCCTTTGTC CAGAGAAGCT CAGGGTATAG CTGAATAGGC AGTTTCTTTT GTCCTGAGGA AAATCAGGAC ATGCCTGCTT TCTAAAAATC TTCCTCTGAA GACCTGACCC AAGCTCTTAA ATGCTATTGT AAGAGAAAT TCTTTGTCTA TTAACCTCAT TTTAGTAGGG ATTCAGTAC TAGATTTTAC TGAACATGA AAATAAATAC ACATAATTTT TCACAAAATT TTGGGCCCAA TTCCCTAAA AGAATTGAGG ATTAGGGAGA AAGGAGACAA CTCAAAGTCA TCCCATTAAG TGCAGTTTCT TTGAATCTTC TGCTTTATCT TAAAAAATTT GTATAATTTA TATATTTTAT TCTATGTGTT CCATAGATAT CTTAATGTAA AATTAGTCAT TTAAATTACA CTGTCAATTA AAAGTAATGG GCAAGAGATT GCATCATACT AATTTAGTAA GAACGTTCCC AAATGTTGTA ACAATGTGGA TCATACATCT CTGGTTTTTT AAATGTATIG AGGCTTCTT GGTGGACTAG TATAGTATAC GGTCAGTTAT GTCAATGTTT CATGGTCAAT AAAAAGGAAG TTGCAAAATTG T (SEQ ID NO: 30)
Mono Cynomolgus	Aminoácido de TSLP		YDFTNCDFEKIEADYLRTISKDLITYMSGTKSTD FNNTVSCSNRPHCLTEIQLTFNPTPRCASLAKE MFARKTKATLALWCPGYSETQINATQAMKKRR KRKVTTNKCLEQVSQLLGLWRRFIRTLKKQ (SEQ ID NO: 31)
Mono Cynomolgus	ARNm de TSLP		TACGACTTCACCAACTGCGACTTCGAGAAGAT CGAGGCCGACTACCTGAGAACCATCAGCAAG GACCTGATCACCTACATGAGCGGCACCAAGA GCACCGACTTCAACAACACCGTGTCTGCAGC AACAGACCCCACTGCCTGACCGAGATCCAGA GCCTGACCTTCAACCCACCCCAAGATGTGCC AGCCTGGCCAAAGAGATGTTGCCAGAAAGA CCAAGGCCACCCTGGCCCTGTGGTGTCCCGGC TACAGCGAGACACAGATCAACGCCACACAGG CCATGAAGAAGCGGCGGAAGCGGAAGTGAC CACCAACAAGTGCTGGAACAGGTGTCACAG CTGCTGGGGCTGTGGCGGCGGTTTCATCCGGAC CCTGCTGAAGAAGCAG (SEQ ID NO: 32)

Mus musculus	Aminoácido de la isoforma 1 de TSLP	NP_067342.1	MVLLRSLFILQVLVRMGLTYNFSNCNFTSITKIY CNIIFHDLTGDLKGAKFEQIEDCESKPACLLKIEY YTLNPIPGCPSLPDKTFARRTREALNDHCPGYPE TERNDGTQEMAQEVQNICLNQTSQILRLWYSF MQSPE (SEQ ID NO: 33)
Mus musculus	ARNm de la isoforma 1 de TSLP	NM_021367.2	CACGTTTCAGG CGACAGCATG GTTCTTCTCA GGAGCCTCTT CATCCTGCAA GTACTAGTAC GGATGGGGCT AACTTACAAC TTTTCTAACT GCAACTTCAC GTCAATTACG AAAATATATT GTAACATAAT TTTTCATGAC CTGACTGGAG ATTTGAAAGG GGCTAAGTTC GAGCAAATCG AGGACTGTGA GAGCAAGCCA GCTTGTCTCC TGAAAATCGA GTACTATACT CTCAATCCTA TCCCTGGCTG CCCTTCACTC CCCGACAAAA CATTTGCCCCG GAGAACAAGA GAAGCCCTCA ATGACCACTG CCCAGGCTAC CCTGAAACTG AGAGAAATGA CGGTACTCAG GAAATGGCAC AAGAAGTCCA AAACATCTGC CTGAATCAAA CCTCACAAAT TCTAAGATTG TGGTATTCTT TCATGCAATC TCCAGAATAA AATTAGCTTT CAGCTTCTGC TATGAAAATC TCTATCTTGG TTTtagTGGA CAGAATACTA AGGGTGTGAC ACTTAGAGGA CCACTGGTGT TTATTCTTTA ATTACAGAAG GGATTCTTAA CTTATTTTTT GGCATATCGC TTTTTTCAGT ATAGGTGCTT TAAATGGGAA ATGAGCAATA GACCGTTAAT GGAAATATCT GTACTGTAA TGACCAGCTT CTGAGAAAGTC TTTCTCACCT CCCCTGCACA CACCTTACTC TAGGGCAAAC CTAAGTGTAG TAGGAAGAGA ATTGAAAGTA GAAAAAAAAA ATTAACCAACCA ATGACAGCAT CTAAACCCTG TTTAAAAGGC AAGGATTTTT CTACCTGTAA TGATTCTTCT AACATTCTTA TGCTAAGATT TTACCAAAGA AGAAAATGAC AGTTCGGGCA GTCAGTGCCA TGATGAGGTG GTCTGAAAGA AGATTGTGGA ATCTGGGAGA AACTGCTGAG ATCATATTGC AAATCCAGCT GTCAAAGGGT TCAGACCCAG GACAGTACAA TTCGTGAGCA GATCTCAAGA GCCTTGACCA TCTACGAGAT ATATATTTAA AGTTGTAGAT AATGAATTTT TAATTTATTT TGTGAGCACT TTTGGAAATA TACATGCTAC TTTGTAATGA ATACATTTCT GAATAAAGTA ATTCTCAAGT TTGAAAAAAA AAA (SEQ ID NO: 34)
Mus musculus	ARNm de la isoforma 2 de TSLP	NR_033206.1	ACTCTTGCCA GGCACCTCCC TCCTGTGGGT TGATTCCGTT TTCCTCTTCT CAACTGACTC TGGATTCTGA TACCAGACAC CTTCTGGTG TCTTCCCTC CTATCCCCAT CCCCTTCCCT GTCCCTTTCA TTCAATTTTT AATATCTGGC GGGTTTTTTT TTTTTTTTCT CTCTCTCTGA ACTGTGCCGC TTGTGAGCAG CCAGCTTGTC TCCTGAAAAT CGAGTACTAT ACTCTCAATC

			CTATCCCTGG CTGCCCTTCA CTCCCCGACA AAACATTTGC CCGGAGAACA AGAGAAGCCC TCAATGACCA CTGCCCAGGC TACCCTGAAA CTGAGAGAAA TGACGGTACT CAGGAAATGG CACAAGAAGT CCAAAACATC TGCCTGAATC AAACCTCACA AATTCTAAGA TTGTGGTATT CCTTCATGCA ATCTCCAGAA TAAAATTAGC TTTCAGCTTC TGCTATGAAA ATCTCTATCT TGGTTTTAGT GGACAGAATA CTAAGGGTGT GACACTTAGA GGACCACTGG TGTATTATTCT TTAATTACAG AAGGGATTCT TAACTTATTT TTTGGCATAT CGCTTTTTTC AGTATAGGTG CTTTAAATGG GAAATGAGCA ATAGACCGTT AATGGAAATA TCTGTACTGT TAATGACCAG CTTCTGAGAA GTCTTTCTCA CCTCCCCTGC ACACACCTTA CTCTAGGGCA AACCTAACTG TAGTAGGAAG AGAATTGAAA GTAGAAAAAA AAAATTAAAA CCAATGACAG CATCTAAACC CTGTTTAAAA GGCAAGGATT TTTCTACCTG TAATGATTCT TCTAACATTC CTATGCTAAG ATTTTACCAA AGAAGAAAAAT GACAGTTCGG GCAGTCACTG CCATGATGAG GTGGTCTGAA AGAAGATTGT GGAATCTGGG AGAACTGCT GAGATCATAT TGCAAATCCA GCTGTCAAAG GGTTCAGACC CAGGACAGTA CAATTCGTGA GCAGATCTCA AGAGCCTTGC ACATCTACGA GATATATATT TAAAGTTGTA GATAATGAAT TTCTAATTTA TTTTGTGAGC ACTTTTGGAA ATATACATGC TACTTTGTAA TGAATACATT TCTGAATAAA GTAATTCTCA AGTTTGA AAAA AAAAA (SEQ ID NO: 35)
Rattus norvegicus	Aminoácido de TSLP	XP_008770274. 1	MVLFRYLFILQVVRALTYNFSNCFEMILRIYH ATIFRDLLKDLNGILFDQIEDCDSRTACLLKIDH HTFNPVPGCPSLPEKAFALKTKAALINCPGY SETERNGTLEMTREIRNICLNQTSQILGLWLSIQ S (SEQ ID NO: 36)
Rattus norvegicus	ARNm de TSLP	XM_008772052. 1	TCAGGCAACA GCATGGTTCT TTTTCAGGTAC CTCTTTATCC TGCAAGTGGT ACGGCTGGCA CTAACTTACA ACTTTTCTAA CTGTAACCTC GAGATGATTT TGAGAATATA TCATGCAACA ATTTTTCGTG ACCTGCTTAA AGATTGGAAT GGGATCTTGT TCGACCAAAT CGAGGACTGT GACAGCAGGA CAGCTTGTCT CCTGAAAATC GACCACCATA CCTTCAATCC TGTCCTGGC TGCCCGTCAC TCCCCGAGAA AGCGTTCGCT TTGAAAACGA AAGCGGCCCT CATTAACTAC TGCCCAGGCT ACTCTGAAAC TGAGAGAAAT GGTACTCTGG AAATGACACG AGAAATCAGA AACATCTGCC TGAATCAAAC CTCACAAATT CTAGGATTGT GGCTTTCCTG CATTCAATCT TGAAGAAAAA ATTAGCTTTT GGATTATATT ATGAAAATAT ATATCTTGTT TTTAGTAGAT ATAATACTAA GGGTGTGACA CTAAAAGAA CACTAATGTT TATTCTTTAA TTATAGAAGG GATTCTTAAC TTATTTTGG CATATCGTTG

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

- La isoforma 1 de TSLP más larga está relacionada con el desarrollo de la enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias (Headley et al., 2009, Journal of immunology 182, 1641-1647; Ying et al., 2005, Journal of immunology 174, 8183-8190). El término "TSLP", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la isoforma 1 de TSLP. Tal como se utiliza en esta memoria, la proteína TSLP humana también abarca proteínas que tienen a lo largo de toda su longitud al menos aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del número de acceso a GenBank NP_149024.1. Una secuencia de ácido nucleico de TSLP humana tiene a lo largo de toda su longitud al menos aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico del número de acceso a GenBank NM_033035.4. Las secuencias de las proteínas TSLP murinas, cyno y de otros animales son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la Tabla 1).
- El término "anticuerpo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una proteína o secuencia de polipéptido derivado de una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, de cadena sencilla o múltiple, o inmunoglobulinas intactas, y pueden derivarse de fuentes naturales o de fuentes recombinantes. Un "anticuerpo" de origen natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada una de las cadenas pesadas está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en esta memoria como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada una de las cadenas ligeras está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en esta memoria como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse, además, en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada una de las VH y VL está compuesto por tres CDRs y cuatro FRs dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo camelizado o un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.
- Las expresiones "fragmento de anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno", "fragmento de unión a antígeno del mismo", "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, y similares, tal como se utiliza en esta memoria, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo intacto que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno dado (p. ej., TSLP). Las funciones de unión al antígeno de un anticuerpo pueden realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F (ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento de anticuerpo de dominio único (dAb) (Ward et al., 1989 Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador de péptido artificial que les permite fabricarse como una única cadena de proteínas en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, p. ej., Bird et al., 1988 Science 242: 423-426; y Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Anticuerpos de cadena sencilla de este tipo incluyen una o más "porciones de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se rastrean para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, p. ej., Hollinger y Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126 -1136). Las porciones de los anticuerpos que se unen a antígenos pueden injertarse en armazones basados en polipéptidos tales como fibronectina tipo III (Fn3) (véase la patente de EE.UU. N° 6.703.199, que describe monocuerpos polipeptídicos de fibronectina). Las porciones de unión al antígeno se pueden incorporar en moléculas de cadena sencilla que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión al antígeno (Zapata et al., 1995 Protein Eng. 8 (10):1057-1062; y Patente de EE.UU. N° 5,641,870).

El término «epítipo» incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o de interactuar de otro modo con una molécula. Determinantes epitópicos consisten generalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de hidratos de carbono o azúcares y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítipo puede ser "lineal" o "conformacional". Epítipos conformacionales y lineales se distinguen en que la unión a los primeros pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

La definición del término "parátipo" se deriva de la definición anterior de "epítipo" invirtiendo la perspectiva. Por lo tanto, el término "parátipo", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al área o región de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo al que se une específicamente un antígeno, es decir, al que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo hace contacto físico con el antígeno.

En el contexto de una estructura cristalina derivada de rayos X definida por las coordenadas espaciales de un complejo entre un anticuerpo, p. ej., un fragmento Fab, y su antígeno, el término parátipo se define en esta memoria, a menos que se especifique lo contrario o contradiga el contexto, específicamente definido, como residuos de anticuerpos caracterizados por tener un átomo pesado (es decir, un átomo que no es de hidrógeno) dentro de una distancia especificada, por ejemplo dentro de una distancia de 4 angstrom, de un átomo pesado en un antígeno diana.

La expresión «regiones determinantes de la complementariedad» y el término "CDRs", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que son responsables de la unión a antígeno.

La expresión "anticuerpo monovalente", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un anticuerpo que se une a un solo epítipo en una molécula diana.

La expresión "anticuerpo bivalente", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítipos en al menos dos moléculas diana idénticas. El anticuerpo bivalente también puede reticular las moléculas diana entre sí. Un "anticuerpo bivalente" también se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítipos diferentes en al menos dos moléculas diana idénticas.

La expresión "anticuerpo multivalente" se refiere a una única molécula de unión con más de una valencia, en donde "valencia" se describe como el número de restos de unión a antígeno presentes por molécula de una construcción de anticuerpo. Como tal, la única molécula de unión puede unirse a más de un sitio de unión en una molécula diana. Ejemplos de anticuerpos multivalentes incluyen, pero no se limitan a anticuerpos bivalentes, anticuerpos trivalentes, anticuerpos tetravalentes, anticuerpos pentavalentes y similares, así como a anticuerpos biespecíficos y anticuerpos biparatópicos. Por ejemplo, para la TSLP, un anticuerpo multivalente tal como un anticuerpo TSLP biparatópico tendría un resto de unión que reconoce dos dominios diferentes de TSLP, respectivamente.

La expresión «anticuerpo multivalente» también se refiere a una única molécula de unión que tiene más de un resto de unión a antígeno para dos moléculas diana separadas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une a TSLP y una segunda molécula diana que no es TSLP. En una realización, un anticuerpo multivalente es un anticuerpo tetravalente que tiene cuatro dominios de unión a epítipos. Una molécula tetravalente puede ser biespecífica y bivalente para cada uno de los sitios de unión en esa molécula diana.

La expresión "anticuerpo biparatópico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un anticuerpo que se une a dos epítipos diferentes en una única molécula diana. La expresión también incluye un anticuerpo, que se une a dos dominios de al menos dos moléculas diana, p. ej., un anticuerpo biparatópico tetravalente.

La expresión "anticuerpo biespecífico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un anticuerpo que se une a dos o más epítomos diferentes en al menos dos dianas diferentes.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" como se utilizan en esta memoria se refieren a polipéptidos, incluyendo anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, etc., que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica o que se derivan de la misma fuente genética. Esta expresión también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpos de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítomo particular.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en esta memoria, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que las regiones tanto de marco como CDR se derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de tales secuencias humanas, p. ej., secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o anticuerpo que contiene secuencias marco consensuadas derivadas del análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, tal como se describe en Knappik, et al. (2000. J Mol Biol 296, 57-86). Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina, p. ej., CDR, se pueden definir utilizando esquemas de numeración bien conocidos, p. ej., el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia o una combinación de Kabat y Chothia (véase, p. ej., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds.. Kabat et al.; Al Lazikani et al., (1997) J. Mol. Bio. 273:927-948); Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edic., NIH Publication nº 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; y Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948).

Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*, o una sustitución conservadora para fomentar la estabilidad o la fabricación). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en esta memoria, no pretende incluir anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco humanas.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza en esta memoria, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina humana. o un hibridoma preparado a partir del mismo, anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, p. ej., de un transfectoma, anticuerpos aislados de una colección de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implican el corte y empalme de todo o de una parte de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias a otras secuencias de ADN. Anticuerpos humanos recombinantes de este tipo tienen regiones variables en las que las regiones de marco y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, anticuerpos humanos recombinantes de este tipo pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de las secuencias VH y VL de la línea germinal humana y están relacionadas con ellas, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

La expresión "región Fc", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un polipéptido que comprende CH3, CH2 y al menos una parte de la región bisagra de un dominio constante de un anticuerpo. Opcionalmente, una región Fc puede incluir un dominio CH4, presente en algunas clases de anticuerpos. Una región Fc puede comprender la región bisagra completa de un dominio constante de un anticuerpo. En una realización, la invención comprende una región Fc y una región CH1 de un anticuerpo. En una realización, la invención comprende una región CH3 de la región Fc de un anticuerpo. En otra realización, la invención comprende una región Fc, una región CH1 y una región Ckappa/lambd del dominio constante de un anticuerpo. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante, p. ej., una región constante de cadena pesada. En una realización, una región constante de este tipo se modifica en comparación con una región constante de tipo salvaje. Es decir, los polipéptidos de la invención descritos en esta memoria pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o en el dominio de región constante de cadena ligera (CL). Modificaciones de ejemplo incluyen adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios. Cambios de este tipo pueden incluirse para optimizar la función efectora, la semivida, etc.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos individuales. Dentro de cada uno de los sitios antigénicos, la región variable del "brazo" del anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte es la afinidad. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "alta afinidad" por un anticuerpo IgG o un fragmento del mismo (p. ej., un fragmento Fab) se refiere a un anticuerpo que tiene una reducción de 10^{-8} M o menos, 10^{-9} M o menos, 10^{-10} M, 10^{-11} M o menos, 10^{-12} M o menos, 10^{-13} M o menos para un antígeno diana. Sin

embargo, la unión de alta afinidad puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de alta afinidad por un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una reducción de 10^{-7} M o menos o 10^{-8} M o menos.

Como se utiliza en esta memoria, el término "avidez" se refiere a una medida informativa de la estabilidad o fuerza global del complejo anticuerpo-antígeno. Está controlado por tres factores principales: afinidad por el epítipo del anticuerpo; la valencia tanto del antígeno como del anticuerpo; y la disposición estructural de las partes que interactúan. En última instancia, estos factores definen la especificidad del anticuerpo, es decir, la probabilidad de que el anticuerpo particular se una a un epítipo de antígeno preciso.

La expresión "especificidad de unión", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la capacidad de un sitio de combinación de anticuerpo individual de reaccionar con un determinante antigénico y no con un determinante antigénico diferente. El sitio de combinación del anticuerpo se encuentra en la porción Fab de la molécula y se construye a partir de las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera. La afinidad de unión de un anticuerpo es la fuerza de la reacción entre un determinante antigénico único y un sitio de combinación único en el anticuerpo. Es la suma de las fuerzas de atracción y repulsión que operan entre el determinante antigénico y el sitio de combinación del anticuerpo.

Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar un cambio o trastorno fisiológico no deseado. Para el propósito de esta invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

El término "sujeto" se refiere a un animal, ser humano o no humano, al que se le proporciona el tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención. Se contemplan aplicaciones veterinarias y no veterinarias. La expresión incluye, pero no se limita a, mamíferos, p. ej., seres humanos, otros primates, cerdos, roedores, tales como ratones y ratas, conejos, cobayas, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. Sujetos típicos incluyen seres humanos, animales de granja y mascotas domésticas tales como gatos y perros.

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

La expresión "ácido nucleico" o el término "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos en forma de cadena sencilla o de doble cadena. A menos que se limite específicamente, la expresión/el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos que se producen de forma natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNPs y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o su totalidad) se sustituya con residuos de desoxiinosina o base mixta (Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985) y Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)).

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente, y se refieren a un compuesto formado por residuos de aminoácidos enlazados de forma covalente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos, y no se establece limitación alguna en el número máximo de aminoácidos que puede comprender una secuencia de proteína o péptido. Polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprenda dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en esta memoria, el término se refiere tanto a cadenas cortas, a las que también se alude comúnmente en la técnica como péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, como a cadenas más largas, a las que generalmente se alude en la técnica como proteínas, de las cuales hay muchos tipos. "Polipéptidos" incluyen, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados,

análogos, proteínas de fusión, entre otros. Un polipéptido incluye un péptido natural, un péptido recombinante o una combinación de los mismos.

La expresión "modificaciones de secuencia conservativas" se refiere a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Modificaciones conservativas de este tipo incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención mediante técnicas estándares conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de una molécula, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, de la invención se pueden reemplazar por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y la molécula alterada se puede testar utilizando los ensayos funcionales descritos en esta memoria.

El término "homólogo" o "identidad" se refiere a la identidad de secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, p. ej., entre dos moléculas de ácido nucleico, tales como dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de subunidad en ambas moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica; p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas o idénticas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas; p. ej., si la mitad (p. ej., cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias son homólogas, las dos secuencias son 50% homólogas; si el 90% de las posiciones (p. ej., 9 de 10) coinciden o son homólogas, las dos secuencias son 90% homólogas. El porcentaje de « identidad de la secuencia » se puede determinar comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación, en que el fragmento de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (p. ej., huecos o colgantes) en comparación con la secuencia de referencia. (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se puede calcular determinando el número de posiciones en las que aparece el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. El resultado es el porcentaje de identidad de la secuencia del sujeto con respecto a la secuencia de la consulta.

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

En algunas realizaciones, la formulación de polvo seco de la presente solicitud comprende partículas de núcleo-envoltura que comprenden: un excipiente formador de la envoltura y un núcleo que comprende el API, excipientes formadores de vidrio y un tampón, al que a veces también se alude en esta memoria como la formulación de plataforma o formulación de plataforma de envoltura y núcleo.

La expresión "ingrediente activo", "ingrediente terapéuticamente activo", "agente activo", el término "fármaco" o la expresión "sustancia farmacéutica", tal como se utiliza en esta memoria significa el ingrediente activo de un producto farmacéutico, también conocido como ingrediente farmacéutico activo (API).

La expresión "diámetro medio de masa" o el término "MMD" o "x50", tal como se utiliza en esta memoria, significa el diámetro mediano de una pluralidad de partículas, típicamente en una población de partículas polidispersas, es decir, que consiste en un intervalo de tamaños de partículas. Los valores de MMD, como se reseña en esta memoria, se determinan mediante difracción por láser (Sympatec Helos, Clausthal-Zellerfeld, Alemania), a menos que el contexto indique lo contrario. Por el contrario, d_g representa el diámetro geométrico para una sola partícula.

La expresión "densidades compactadas" o $\rho_{\text{compactada}}$, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una densidad de partículas medida de acuerdo con el Método I, tal como se describe, por ejemplo, en www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/m99375-bulk_density_and_tapped_density_of_powders.pdf. Las densidades compactadas representan la aproximación más

cercana de la densidad de partículas, con valores medidos que son aproximadamente un 20% menos que la densidad de partículas real.

El término "rugoso", tal como se utiliza en esta memoria, significa que tiene numerosas arrugas o pliegues, es decir, que está estriado o arrugado.

El término "rugosidad", tal como se utiliza en esta memoria, es una medida de la rugosidad de la superficie de una partícula modificada por ingeniería. Para los propósitos de esta invención, la rugosidad se calcula a partir del área de superficie específica obtenida de mediciones según BET, la densidad verdadera obtenida de la picnometría de helio y la relación de superficie a volumen obtenida por difracción láser (Sympatec), a saber:

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

en que $S_v = 6/D_{32}$, en que D_{32} es el diámetro promedio basado en el área de superficie unitaria. Se espera que los aumentos en la rugosidad de la superficie reduzcan las fuerzas de cohesión entre partículas y mejoren la fijación de objetivo del aerosol a los pulmones. Se espera que una mejor fijación del objetivo a los pulmones reduzca la variabilidad entre pacientes y los niveles de fármaco en la orofaringe y la circulación sistémica. En una o más realizaciones, la rugosidad S_v es de 3 a 20, p. ej., de 5 a 10.

La expresión "diámetro aerodinámico de la mediana de las partículas primarias" o D_a , tal como se utiliza en esta memoria se calcula a partir del tamaño geométrico primario de las partículas determinado mediante difracción de láser (x50), y su densidad compactada, a saber: $D_a = x50 (\rho_{\text{compactada}})^{1/2}$.

La expresión "dosis administrada" o el término "DD", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una indicación del suministro de polvo seco desde un dispositivo inhalador después de un evento de activación o dispersión desde una unidad de polvo. La DD se define como la relación entre la dosis suministrada mediante un dispositivo inhalador y la dosis nominal o medida. La DD es un parámetro determinado experimentalmente y puede determinarse utilizando un dispositivo *in vitro* configurado que imita la dosificación del paciente.

La expresión "diámetro aerodinámico mediano de masa" o el término "MMAD", tal como se utiliza en esta memoria se refiere al tamaño aerodinámico mediano de una pluralidad de partículas, típicamente en una población polidispersa. El "diámetro aerodinámico" es el diámetro de una esfera de densidad unitaria que tiene la misma velocidad de sedimentación, generalmente en el aire, que un polvo y, por lo tanto, es una forma útil de caracterizar un polvo aerosolizado u otra partícula o formulación de partículas dispersas en términos de su comportamiento de sedimentación. Las distribuciones aerodinámicas del tamaño de partículas (APSD) y MMAD se determinan en esta memoria por impacto en cascada, utilizando un NEXT GENERATION IMPACTOR™. En general, si las partículas son aerodinámicamente demasiado grandes, menos partículas llegarán al pulmón profundo. Si las partículas son demasiado pequeñas, se puede exhalar un porcentaje mayor de las partículas. Por el contrario, d_g representa el diámetro aerodinámico para una sola partícula.

La expresión "dosis pulmonar total" (TLD), tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al porcentaje de ingrediente o ingredientes activos que no se depositan en un modelo idealizado de boca y garganta de Alberta después de la inhalación de polvo de un inhalador de polvo seco a una caída de presión de 4 kPa. Los datos se pueden expresar como un porcentaje de la dosis nominal o la dosis administrada. El AIT representa una versión idealizada del tracto respiratorio superior para un sujeto adulto promedio. A menos que se indique lo contrario, la TLD se mide en el modelo de garganta idealizado de Alberta. Puede encontrar información sobre el AIT y una descripción detallada de la configuración experimental en: www.copleyscientific.com.

La expresión "parámetro de inercia", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere al parámetro que caracteriza la impactación inercial en el tracto respiratorio superior. El parámetro se derivó de la Ley de Stoke y es igual a $d_a^2 Q$, en que d_a es el diámetro aerodinámico, y Q es el caudal volumétrico.

La expresión "contenido en sólidos", tal como se utiliza en esta memoria se refiere a la concentración de ingrediente o ingredientes activos y excipientes disueltos o dispersados en la solución o dispersión líquida que se ha de secar por pulverización.

El término "ALR", tal como se utiliza en esta memoria, es un parámetro de proceso que define la relación de aire a líquido utilizada en un atomizador. Valores de ALR más pequeños producen típicamente gotas atomizadas más grandes.

La expresión "densidad de población de partículas" (PPD), tal como se utiliza en esta memoria, es un número adimensional calculado a partir del producto del contenido de sólidos y el caudal de líquido del atomizador, dividido por el caudal total de gas del secador. Se ha observado que el PPD se correlaciona con el tamaño de partícula geométrico primario.

Moléculas de Unión a TSLP

En esta memoria se describen moléculas, p. ej., anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, incluyendo Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv y dAb, scFvs, anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NARs y bis-SCFvs, que se unen específicamente a TSLP e inhiben la actividad de TSLP. Estas moléculas son útiles para tratar afecciones inflamatorias relacionadas con TSLP, incluyendo asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Dado que TSLP es una citoquina nodal clave aguas arriba de las citoquinas efectoras Th2, la inhibición de TSLP puede bloquear simultáneamente múltiples efectores Th2 aguas abajo (p. ej., IL-4, IL-5, IL-13) y también puede afectar las vías no mediadas por Th2 (p. ej., IL-17, IFN- γ).

Anticuerpos TSLP y fragmentos de anticuerpos de unión a TSLP

En un aspecto, en esta memoria se proporcionan moléculas de la invención como se definen en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a TSLP humana. Los fragmentos de anticuerpos de TSLP incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos de anticuerpos humanos y humanizados generados como se describe en esta memoria, incluidos en los Ejemplos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno aislado, que se une a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 100 pM, p. ej., una K_D de menos de 90 pM, menos de 80 pM, menos de 70 pM, menos de 60 pM, menos de 50 pM, menos de 40 pM, menos de 30 pM, menos de 20 pM, menos de 10 pM. En algunas realizaciones, los fragmentos de unión a antígeno aislados proporcionados en esta memoria se unen a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 10 pM.

En algunas realizaciones, las moléculas de unión a TSLP proporcionadas en esta memoria incluyen una CDR1 de cadena pesada, una CDR2 de cadena pesada, una CDR3 de cadena pesada y una CDR1 de cadena ligera, una CDR2 de cadena ligera y una CDR3 de cadena ligera. En algunas realizaciones, las moléculas de unión a TSLP proporcionadas en esta memoria incluyen una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3. En algunas realizaciones, las moléculas de unión a TSLP proporcionadas en esta memoria incluyen una secuencia de cadena pesada de longitud completa y una secuencia de cadena ligera de longitud completa. La molécula de la invención es un Fab de unión a TSLP.

La Tabla 2 enumera las secuencias de anticuerpos y Fabs de unión a TSLP ejemplares, todos los cuales se unen a TSLP humana con alta afinidad. Por ejemplo, Fab1 anti-TSLP se une a TSLP humana recombinante con una constante de disociación (K_D) de 6 pM. En algunas realizaciones, Fab1 anti-TSLP se une a proteínas TSLP de ser humano y mono cynomolgus con valores de K_D de $5,0 \pm 2,0$ pM y $1,4 \pm 0,6$ pM, respectivamente.

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

mAb1 anti-TSLP		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Combinada)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinada)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinada)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHISKTDAGTTDY AAPVKGRTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYAFDSWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 8	ADN de VH	GAGGTTTCAGCTGGTGGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTTAGACTTA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTAGACAGGCCCT GGTAAAGGCTTGGAGTGGGTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCCGTTAAGGGCCGGTTCACTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCCTCTACC TTCAAATGAATAGCCTTAAGACCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAATCTAC TACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAAGGCA CCCTCGTGACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 9	Cadena Pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHISKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYYAFDSWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K

SEQ ID NO: 10	ADN de Cadena Pesada	GAGGTTTCAGCTGGTGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTTAGACTTA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTTAGACAGGCCCT GGTAAAGGCTTGGAGTGGGTTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCCGTTAAGGGCCGGTTCACTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCCTCTACC TTCAAATGAATAGCCTTAAGACCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAATCTAC TACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAAGGCA CCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAA GGGCCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGC AGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCC TGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGA GCCCCGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGGGCT CTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCG TGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAG CAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTG GGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCC ACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAAGT GCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCC CCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGAC GTGTCCACAGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACA ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGT ACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCG AGAACAACACTACAAGACCACCCCCCAGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGC AAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Combinada)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Combinada)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Combinada)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY

SEQ ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVLYIGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 18	ADN de VL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGCGTTA GCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTTCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAG CCCCCGTGCTCGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 19	Cadena Ligera	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVLYIGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 20	ADN de Cadena Ligera	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGCGTTA GCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTTCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAG CCCCCGTGCTCGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTGGGTCAACCTAAGGCTGCCCC CAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCCAGCAGCGAG GAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGT GCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGT GACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCC CGTGAAGGCCGGCGTGAGAGACCACCACCCCC AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGT GGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGT GACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAGAGAC CGTGCCCCCAACCGAGTGCAGC
Fab1 anti-TSLP		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Combinada)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Combinada)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Combinada)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT

SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHISKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYAFDSWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 21	ADN de VH	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGA CTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTCAGACAGGCCCT GGTAAAGGCCTGGAGTGGGTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCTGTGAAGGGCCGGTTCCTACTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGATCTA CTACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAGGGC ACCCTGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 22	Cadena Pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHISKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYAFDSWGQGLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 23	ADN de Cadena Pesada	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGA CTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTCAGACAGGCCCT GGTAAAGGCCTGGAGTGGGTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCTGTGAAGGGCCGGTTCCTACTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGATCTA CTACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAGGGC ACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTA AGGGCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTCC AGCAAGTCTACCTCTGGCGGCACCGCTGCTC TGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGA GCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCC CTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCTGCCG TGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC TCCGTGGTGACAGTGCCTTCCCTCCAGCCTGG GCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCG GGTGGAGCCTAAGTCATGC
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Combinada)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Combinada)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Combinada)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY

SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY
SEQ ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 24	ADN de VL	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTCA GCGTGGCCCTGGGTCAGACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGG CCCCCGTGCTGGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 25	Cadena Ligera	SYELTQPLSVSVVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVLVIYGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 26	ADN de Cadena Ligera	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTCA GCGTGGCCCTGGGTCAGACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGG CCCCCGTGCTGGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTGGGTCAGCCTAAGGTGCCCC CAGCGTGACCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAG GAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGT GCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGT GACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCC CGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGT GGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGT GACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAGAGAC CGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC

La invención proporciona un fragmento de anticuerpo según se define en la reivindicación 1.

- 5 La divulgación proporciona fragmentos de unión a antígeno que comprenden (o, alternativamente, consisten en) una secuencia de aminoácidos de VH enumerada en la Tabla 2, en donde no más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 aminoácidos en una secuencia marco (por ejemplo, una secuencia que no es una CDR) han mutado (en donde una mutación es, como diversos ejemplos no limitativos, una adición, sustitución o delección).
- 10 La divulgación proporciona también fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a TSLP, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (o, alternativamente, consistiendo en) una secuencia de aminoácidos de VL enumerada en la Tabla 2, en donde no más de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 aminoácidos en una secuencia marco (por ejemplo, una secuencia que no es una CDR) han mutado (en donde una mutación es, como diversos ejemplos no limitativos, una adición, sustitución o delección).

5 La presente invención también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican VH, VL, la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa de los fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a la proteína TSLP. Secuencias de ácidos nucleicos de este tipo se pueden optimizar para la expresión en células de mamífero.

10 Otros fragmentos de unión a antígeno TSLP de la divulgación incluyen aquellos en los que los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos han sido mutados, pero tienen al menos 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad con las secuencias descritas en la Tabla 2. En una realización, los fragmentos de unión a antígeno incluyen secuencias de aminoácidos mutantes, en donde no han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones variables en comparación con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la Tabla. 2, conservando
15 sustancialmente la misma actividad terapéutica.

Dado que cada uno de los anticuerpos descritos en esta memoria se puede unir a TSLP, las secuencias de VH, VL, cadena ligera de longitud completa y cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) se pueden "mezclar y emparejar". para crear otros anticuerpos de unión a TSLP y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Anticuerpos de unión a TSLP "mezclados y emparejados" de este tipo se pueden testar utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica (p. ej., ELISAs y otros ensayos descritos en la sección de Ejemplos). Cuando estas cadenas se mezclan y emparejan, una secuencia VH de un emparejamiento VH/VL particular debería reemplazarse por una secuencia VH estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un emparejamiento particular de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa debería reemplazarse por una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia VL de un emparejamiento VH/VL particular debería reemplazarse por una secuencia VL estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena ligera de longitud completa de un emparejamiento particular de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa debería reemplazarse por una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar.
20
25
30

En otro aspecto, la presente invención proporciona fragmentos de anticuerpo de unión a TSLP que comprenden CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y de cadena ligera, según se describe en la Tabla 2, o combinaciones de los mismos. Las regiones CDR se delinean utilizando el sistema Kabat (Kabat et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N° 91-3242), o utilizando el sistema de Chothia (Chothia et al. 1987 J. Mol. Biol. 196: 901-917; y Al-Lazikani et al. 1997 J. Mol. Biol. 273: 927-948). Alternativamente, pueden utilizarse otros métodos para delinear las regiones CDR. Por ejemplo, pueden combinarse las definiciones de CDR tanto de Kabat como de Chothia.
35

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a TSLP y que la especificidad de unión a antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de CDR1, 2 y 3 de VH y las secuencias CDR1, 2 y 3 de VL pueden ser "mezcladas y emparejadas" (es decir, las CDRs de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y emparejar, aunque cada uno de los anticuerpos debe contener una CDR1, 2 y 3 de VH y una CDR1, 2 y 3 de VL para crear otras moléculas de unión a TSLP. Anticuerpos "mezclados y emparejados" que se unen a TSLP de este tipo se pueden testar utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica y los descritos en los Ejemplos (p. ej., ELISAs). Cuando las secuencias de CDR de VH se mezclan y emparejan, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VH particular debería reemplazarse por una secuencia de CDR estructuralmente similar. Asimismo, cuando las secuencias de CDR de VL se mezclan y emparejan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VL particular debería reemplazarse por una secuencia o secuencias de CDR de estructura similar. Resultará fácilmente evidente para los expertos ordinarios en la materia, que se pueden crear nuevas secuencias de VH y VL mutando una o más secuencias de la región CDR de VH y/o VL con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR mostradas en esta memoria para los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación.
40
45
50

Por consiguiente, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal aislado que comprende una CDR1 de la región variable de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 4 o 5; una CDR2 de la región variable de la cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 2 o 6; una CDR3 de la región variable de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 11 o 14; una CDR2 de la región variable de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 12 o 15 y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 13 o 16; en donde el fragmento de anticuerpo se une específicamente a TSLP, y en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab.
55
60

En algunas realizaciones, un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a TSLP es un fragmento de anticuerpo descrito en la Tabla 2.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo aislado, que se une a TSLP humano y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de las SEQ ID NOs: 4, 2 y 3, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de las SEQ ID NOs: 11, 12 y 13, respectivamente.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo aislado, que se une a TSLP humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de las SEQ ID NOs: 5, 6 y 3, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de las SEQ ID NOs: 14, 15 y 16, respectivamente.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo aislado, que se une a TSLP humana y comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de las SEQ ID NOs: 1, 2 y 3, respectivamente, y las secuencias LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de las SEQ ID NOs: 11, 12 y 13, respectivamente.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo aislado, que se une a TSLP humana y comprende una VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y una VL que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo aislado, que se une a TSLP humana y comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo aislado, que se une a TSLP humana y comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

Como se utiliza en esta memoria, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera o cadenas pesadas o ligeras de longitud completa que son "el producto de" o "se derivan de" una secuencia de línea germinal particular, si las regiones variables o las cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Sistemas de este tipo incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o rastrear una genoteca de inmunoglobulina humana presentada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se derivan de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando la inmunoglobulina de la línea germinal humana, secuencia que es la más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es « el producto de » o « derivado de » una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas que se producen de forma natural o a la introducción intencionada de mutaciones. Sin embargo, en las regiones marco de VH o VL, un anticuerpo humano seleccionado es típicamente al menos 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican al anticuerpo humano como humano. en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (p. ej., secuencias de la línea germinal murina). En determinados casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 60%, 70%, 80%, 90% o al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano recombinante no mostrará más de 10 diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana en las regiones marco de VH o VL. En determinados casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Anticuerpos Homólogos

Aún en otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias descritas en la Tabla 2, y dicho anticuerpo se une a TSLP y conserva las propiedades funcionales deseadas de esos anticuerpos descritos en la Tabla 2.

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

En una realización, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias recogidas en la Tabla 2. En una realización, las secuencias de aminoácidos de VH y/o VL pueden ser idénticas excepto en una sustitución de aminoácidos en no más de 1, 2, 3, 4 o 5 posiciones de aminoácidos. Un anticuerpo que tiene regiones VH y VL que tienen una identidad alta (es decir, 80% o mayor) con las regiones VH y VL de las descritos en la Tabla 2 se puede obtener mediante mutagénesis (p. ej., mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácidos nucleicos que codifican la SEQ ID NO: 8 o 21, o la SEQ ID NO: 18 o 24, respectivamente, seguido de testar el anticuerpo alterado codificado en cuanto a la función retenida utilizando los ensayos funcionales descritos en esta memoria.

En una realización, las secuencias de aminoácidos de cadena pesada de longitud completa y/o de cadena ligera de longitud completa pueden ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias recogidas en la Tabla 2. Un anticuerpo que tiene una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa que tiene una identidad alta (es decir, 80% o mayor) con la cadena pesada de longitud completa de SEQ ID NO: 9; y la cadena ligera de longitud completa de SEQ ID NO: 19, se puede obtener mediante mutagénesis (p. ej., mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de este tipo, respectivamente, seguido de testar el anticuerpo alterado codificado para determinar la función retenida utilizando los ensayos funcionales descritos en esta memoria.

En una realización, las secuencias de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa y/o de cadena ligera de longitud completa pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias recogidas en la Tabla 2.

En una realización, las regiones variables de las secuencias de nucleótidos de cadena pesada de longitud completa y/o de cadena ligera de longitud completa pueden ser 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a las secuencias recogidas en la Tabla 2.

Tal como se utiliza en esta memoria, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de identidad es igual al número de posiciones idénticas/número total de posiciones X 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada uno de los huecos, que deben introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr utilizando un algoritmo matemático, tal como se describe en los ejemplos no limitantes que figuran más adelante.

Adicional o alternatively, las secuencias de proteínas de la presente divulgación pueden utilizarse, además, como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Por ejemplo, búsquedas de este tipo se pueden realizar utilizando el programa BLAST (versión 2.0) de Altschul, et al., 1990 J. Mol. Biol. 215:403-10.

Anticuerpos con Modificaciones Conservativas

En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2, y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR tienen secuencias de aminoácidos especificadas sobre la base de los anticuerpos descritos en esta memoria o modificaciones conservativas de las mismas, y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los fragmentos de unión a antígeno de unión a TSLP de la invención. Por consiguiente, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que consiste en una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde: una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 4 o 5, o variantes conservativas de la misma; una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 2 o 6, o variantes conservativas de la misma; una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o variantes conservativas de la misma; una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 11 o 14 o variantes conservativas de la misma; una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 12 o 15 o variantes conservativas de la misma; una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 13 o 16, o variantes conservativas de la misma; el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a TSLP e inhibe TSLP.

En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la divulgación tiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde las regiones variables de cadena pesada y ligera tienen secuencias de aminoácidos especificadas sobre la base de los anticuerpos descritos en esta memoria o

modificaciones conservativas de las mismas, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los fragmentos de unión a TSLP antígeno de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal aislado que consiste en una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o variantes conservativas de la misma; una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, o variantes conservativas de la misma; el fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a TSLP e inhibe TSLP.

Ácidos Nucleicos que Codifican los Anticuerpos

La invención proporciona moléculas de ácido nucleico sustancialmente purificadas que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de los anticuerpos de TSLP arriba descritos y como se define en las reivindicaciones adjuntas. Polinucleótidos de este tipo pueden codificar al menos una región CDR y habitualmente las tres regiones CDR de la cadena pesada o ligera de los anticuerpos TSLP descritos en esta memoria. Polinucleótidos de este tipo también pueden codificar la totalidad o sustancialmente la totalidad de la secuencia de la región variable de la cadena pesada y/o la cadena ligera de los anticuerpos TSLP descritos en esta memoria. Polinucleótidos de este tipo también pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Debido a la degeneración del código, una diversidad de secuencias de ácidos nucleicos codificarán cada una de las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas.

Las secuencias de polinucleótidos se pueden producir por síntesis de ADN en fase sólida *de novo* o por mutagénesis por PCR de una secuencia existente (p. ej., las secuencias como se describe en los Ejemplos que figuran más adelante) que codifican un anticuerpo de unión a TSLP o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como el método del fosfotriéster de Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90; el método del fosfodiéster de Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979; el método de dietilfosforoamidita de Beaucage et al., Tetra. Lett., 22: 1859, 1981; y el método de soporte sólido de la patente de EE.UU. Nº 4.458.066. La introducción de mutaciones en una secuencia de polinucleótidos mediante PCR se puede realizar tal como se describe, p. ej., en PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif., 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; y Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

También se proporciona en la invención vectores de expresión y células huésped para la producción de los anticuerpos de unión a TSLP arriba descritos y como se define en las reivindicaciones adjuntas. Se pueden emplear diversos vectores de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos de unión a TSLP o fragmentos de unión. Pueden utilizarse vectores de expresión tanto basados en virus como no víricos para producir los anticuerpos en una célula huésped de mamífero. Vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, p. ej., Harrington et al., Nat Genet. 15:345, 1997). Por ejemplo, vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos de unión a TSLP en células de mamíferos (p. ej., seres humanos) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, Calif.), vectores MPSV y numerosos otros vectores conocidos en la técnica para expresar otras proteínas. Vectores virales útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes, vectores basados en SV40, papilomavirus, virus HBP Epstein Barr, vectores de virus vaccinia y el virus del bosque Semliki (SFV). Véase, Brent et al., supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; y Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células huésped previstas en las que se ha de expresar el vector. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (p. ej., potenciadores) que están enlazadas operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena de anticuerpo de unión a TSLP o fragmento de unión a antígeno. En una realización, se emplea un promotor inducible para prevenir la expresión de secuencias insertadas, excepto en condiciones de inducción. Promotores inducibles incluyen, p. ej., arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o promotor de choque térmico. Cultivos de organismos transformados se pueden expandir en condiciones no inductoras sin sesgar la población para codificar secuencias, cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células huésped. Además de los promotores, también pueden requerirse o desearse otros elementos reguladores para la expresión eficiente de una cadena de anticuerpo de unión a TSLP o fragmento de unión a antígeno. Estos elementos incluyen típicamente un codón de iniciación ATG y un sitio de unión al ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficacia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular en uso (véase, p. ej., Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; y Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Por ejemplo, el potenciador de SV40 o potenciador de CMV puede utilizarse para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpos de unión a TSLP insertadas. Más a menudo, las secuencias de anticuerpos de unión a TSLP insertadas están enlazadas a secuencias señal antes de su

inclusión en el vector. Vectores que se han de utilizar para recibir secuencias que codifican los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo de unión a TSLP a veces también codifican regiones constantes o partes de las mismas. Vectores de este tipo permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes, conduciendo con ello a la producción de anticuerpos intactos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Típicamente, regiones constantes de este tipo son humanas.

Las células huésped para albergar y expresar las cadenas de anticuerpos de unión a TSLP pueden ser procarióticas o eucarióticas. *E. coli* es un huésped procariótico útil para clonar y expresar los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procarióticos también se pueden hacer vectores de expresión, que típicamente contienen secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (p. ej., un origen de replicación). Además, estará presente cualquier número de una diversidad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores controlan típicamente la expresión, opcionalmente con una secuencia de operador, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción. Otros microbios, tales como levaduras, también se pueden emplear para expresar polipéptidos de unión a TSLP de la invención. También se pueden utilizar células de insectos en combinación con vectores de baculovirus.

En una realización, las células huésped de mamífero se utilizan para expresar y producir los polipéptidos de unión a TSLP de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser una línea celular de hibridoma que expresa genes de inmunoglobulina endógenos (p. ej., el clon de hibridoma de mieloma 1D6.C9 tal como se describe en los Ejemplos) o una línea celular de mamífero que alberga un vector de expresión exógeno (p. ej., las células de mieloma SP2 / 0 ejemplificadas más adelante). Estos incluyen cualquier célula humana o animal mortal normal o inmortal normal o anormal. Por ejemplo, se han desarrollado varias líneas de células huésped adecuadas, capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluyendo las líneas de células CHO, diversas líneas de células Cos, células HeLa, líneas de células de mieloma, células B transformadas e hibridomas. El uso de cultivo de células de tejido de mamíferos para expresar polipéptidos se comenta en general en, p. ej., Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, NY, NY, 1987. Los vectores de expresión para células huésped de mamíferos pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (véase, p. ej., Queen, et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión de ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Estos vectores de expresión contienen habitualmente promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos para el tipo de célula, específicos para la etapa y/o modulables o regulables. Promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de metalotioneína, el promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, el promotor de MMTV inducible por dexametasona, el promotor de SV40, el promotor de MRP polIII, el promotor de MPSV constitutivo, el promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como como el promotor humano inmediato-temprano de CMV), el promotor constitutivo de CMV y las combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

Métodos para introducir vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procarióticas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden utilizar para otros huéspedes celulares. (Véase en general Sambrook, et al., supra). Otros métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, conjugados de polimerización:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión con la proteína estructural del virus del herpes VP22 (Elliot y O'Hare, Cell 88:223, 1997), captación de ADN potenciada por agentes y transducción ex vivo. Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, a menudo se deseará una expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresan de forma estable cadenas de anticuerpos de unión a TSLP o fragmentos de unión pueden prepararse utilizando vectores de expresión de la invención que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas de forma estable pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Generación de Anticuerpos y Fragmentos de Anticuerpos

Pueden producirse anticuerpos monoclonales (mAbs) mediante una diversidad de técnicas, incluyendo la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, p. ej., la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, 1975 Nature 256: 495. Se pueden emplear muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales, p. ej., transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un

procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. También se conocen participantes en la fusión (p. ej., células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación son anticuerpos monoclonales humanizados. Pueden prepararse anticuerpos quiméricos o humanizados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describió arriba. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse del hibridoma murino de interés y modificarse por ingeniería genética para que contenga secuencias de inmunoglobulinas no murinas (p. ej., humanas) utilizando técnicas de biología molecular estándares. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden enlazar a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., la Pat. de EE.UU. N° 4.816.567 expedida a Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden insertar en un marco humano utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., la Pat. de EE.UU. N° 5.225.539 expedida a Winter y las Pat. de EE.UU. N° 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 expedidas a Queen et al.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la divulgación son anticuerpos monoclonales humanos. Anticuerpos monoclonales humanos de este tipo dirigidos contra TSLP se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunológico humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en esta memoria como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en esta memoria "ratones lg humanos".

El HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.) contiene miniloci del gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (mu y gamma) humana no reordenada y de cadena ligera kappa, junto con mutaciones fijadas como objetivo que inactivan los loci endógenos de las cadenas mu y kappa (véase, p. ej., Lonberg et al., 1994 Nature 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o K de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos experimentan un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG-kappa humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al., 1994 supra; revisado en Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N., 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas portadas por este tipo de ratones se describen adicionalmente en Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., 1993 Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591; y Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851. Véanse, además, las Pat. de EE.UU. N°s 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas expedidas a Lonberg y Kay; la Pat. de EE.UU. N° 5.545.807 expedida a Surani et al.; las Publicaciones PCT N°s WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas expedidas a Lonberg y Kay; y la Publicación PCT N° WO 01/14424 expedida a Korman et al.

En algunas realizaciones, se pueden generar anticuerpos humanos utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Ratones de este tipo, a los que se hace referencia en esta memoria como "ratones KM", se describen en detalle en la Publicación PCT WO 02/43478 expedida a Ishida et al.

Además, en la técnica están disponibles sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para generar anticuerpos de unión a TSLP y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema transgénico alternativo al que se alude como Xenomouse (Abgenix, Inc.). Ratones de este tipo se describen, p. ej., en las Pat. de EE.UU. N° 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 expedidas a Kucheralapati et al.

Además, en la técnica están disponibles sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden utilizarse para generar anticuerpos de unión a TSLP de la divulgación. Por ejemplo, pueden utilizarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, a los que se alude como "ratones TC"; ratones de este tipo se describen en Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera (Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20: 889-894) y se pueden utilizar para generar anticuerpos de unión a TSLP de la divulgación.

Anticuerpos monoclonales humanos también se pueden preparar utilizando métodos de presentación en fagos para rastrear genotecas de inmunoglobulina humana. Métodos de presentación en fagos de este tipo para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica o se describen en los ejemplos que figuran más adelante. Véanse, por ejemplo: Pat. de EE.UU. N°s 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 expedidas a Ladner et al; Pat. de EE.UU. N°s 5.427.908 y 5.580.717 expedidas a Dower et al; Pat. de EE.UU. N°s 5.969.108 y 6.172.197 expedidas a McCafferty et al; y Pat. de

EE.UU. N°s 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 expedidas a Griffiths et al.

Anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunes humanas de modo que se pueda generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Ratones de este tipo se describen, por ejemplo, en las Pat. de EE.UU. N°s 5.476.996 y 5.698.767 expedidas a Wilson et al.

Fragmentos de anticuerpo Fab, o Fabs, pueden generarse digiriendo anticuerpos monoclonales con papaína y luego purificarse mediante cromatografía de afinidad. Fabs también se pueden generar por síntesis recombinante utilizando los ácidos nucleicos que codifican los Fab como se describe arriba. Los fragmentos Fab pueden conservar la especificidad de unión y/o la actividad de una molécula de IgG completa, pero tienen un tamaño más pequeño y pesos moleculares más bajos, lo que puede hacerlos adecuados para diferentes aplicaciones que las moléculas de IgG completas.

Caracterización de los Anticuerpos de la Divulgación

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación pueden caracterizarse mediante diversos ensayos funcionales. Por ejemplo, pueden caracterizarse por su capacidad para unirse a TSLP e inhibir la actividad de TSLP.

La capacidad de un anticuerpo de unirse a TSLP puede detectarse marcando el anticuerpo de interés directamente, o el anticuerpo puede no marcarse y detectarse la unión indirectamente utilizando diversos formatos de ensayo sándwich conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de unión a TSLP y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación bloquean o compiten con la unión de un anticuerpo de unión a TSLP de referencia a un polipéptido de TSLP. Estos pueden ser anticuerpos de unión a TSLP completamente humanos o humanizados arriba descritos. También pueden ser otros anticuerpos de unión a TSLP humanos, de ratón, quiméricos o humanizados que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. La capacidad de bloquear o competir con la unión al anticuerpo de referencia indica que el anticuerpo de unión a TSLP de ensayo se une al mismo o a un epítipo similar que el definido por el anticuerpo de referencia, o a un epítipo que está lo suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de unión a TSLP de referencia. Es especialmente probable que anticuerpos de este tipo compartan las propiedades ventajosas identificadas para el anticuerpo de referencia. La capacidad de bloquear o competir con el anticuerpo de referencia puede determinarse, p. ej., mediante un ensayo de unión competitiva. Con un ensayo de unión competitiva, se examina la capacidad del anticuerpo sometido a ensayo de inhibir la unión específica del anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como el polipéptido de TSLP. Un anticuerpo de ensayo compite con el anticuerpo de referencia por la unión específica al antígeno si un exceso del anticuerpo de ensayo inhibe sustancialmente la unión del anticuerpo de referencia. La inhibición sustancial significa que el anticuerpo de ensayo reduce la unión específica del anticuerpo de referencia por lo general en al menos un 10%, 25%, 50%, 75% o 90%.

Existe un cierto número de ensayos de unión competitiva conocidos que pueden utilizarse para evaluar la competencia de un anticuerpo con un anticuerpo de referencia para unirse a una proteína particular, en este caso, TSLP. Estos incluyen, p. ej., radioinmunoensayo directo o indirecto (RIA) en fase sólida, inmunoensayo enzimático directo o indirecto (EIA) en fase sólida, ensayo de competición en sándwich (véase Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242-253, 1983); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland y col., J. Immunol. 137:3614-3619, 1986); ensayo de marcaje directo en fase sólida, ensayo sándwich de marcaje directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, supra); RIA de marcaje directo en fase sólida utilizando marcaje con I-125 (véase Morel y col., Molec. Immunol. 25:7-15, 1988); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung et al., Virology 176:546-552, 1990); y RIA marcado directamente (Moldenhauer y col., Scand. J. Immunol. 32:77- 82, 1990). Típicamente, un ensayo de este tipo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estos, un anticuerpo de unión a TSLP de ensayo no marcado y un anticuerpo de referencia marcado. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia del anticuerpo de ensayo. Habitualmente, el anticuerpo de ensayo está presente en exceso. Los anticuerpos identificados por ensayo de competición (anticuerpos competidores) incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia y anticuerpos que se unen a un epítipo adyacente suficientemente próximo al epítipo unido por el anticuerpo de referencia para que se produzca un impedimento estérico.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales de unión a TSLP seleccionados se unen a epítopos únicos, cada uno de los anticuerpos puede biotinilarse utilizando reactivos disponibles comercialmente (p. ej., reactivos de Pierce, Rockford, III). Pueden realizarse estudios de competición utilizando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados utilizando placas de ELISA recubiertas con polipéptido TSLP. La unión de MAb biotinilado se puede detectar con una sonda de fosfatasa alcalina de estrepto-avidina. Para determinar el isotipo de un anticuerpo de unión a TSLP purificado, se pueden realizar ELISAs de isotipo. Por ejemplo, pocillos de placas de microtitulación se pueden recubrir con 1 µg/ml de IgG anti-humana durante la noche a 4 grados C. Después del bloqueo con BSA al 1%, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos del anticuerpo monoclonal de unión a TSLP o controles de isotipo

purificados, a temperatura ambiente durante una a dos horas. A continuación, los pocillos se pueden hacer reaccionar con sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específica para IgG1 humana o IgM humana. A continuación, se desarrollan y analizan las placas para poder determinar el isotipo del anticuerpo purificado.

5 Para demostrar la unión de los anticuerpos monoclonales de unión a TSLP frente a células vivas que expresan polipéptido de TSLP, se puede utilizar la citometría de flujo. Brevemente, las líneas celulares que expresan TSLP (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándar) se pueden mezclar con diversas concentraciones de anticuerpo de unión a TSLP en PBS que contenía BSA al 0,1% y suero de ternero fetal al 10%, y se incubaron a 37 grados °C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo IgG anti-humano marcado con fluoresceína bajo las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar con el instrumento FACScan utilizando propiedades de dispersión de la luz y lateral para sincronizar las células individuales. Se puede utilizar un ensayo alternativo que utiliza microscopía de fluorescencia (además o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener una sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

Anticuerpos de unión a TSLP y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la divulgación pueden testarse adicionalmente en cuanto a la reactividad con polipéptido de TSLP o fragmento antigénico por transferencia Western. Brevemente, se pueden preparar polipéptidos de TSLP purificados o proteínas de fusión, o extractos celulares de células que expresan TSLP y someterlos a electroforesis en gel de poliácridamida con dodecilsulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternero fetal al 10% y se sondan con los anticuerpos monoclonales que se han de analizar. La unión de IgG humana puede detectarse utilizando fosfatasa alcalina anti-IgG humana y desarrollarse con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

25 También se describen ejemplos de ensayos funcionales en la sección de Ejemplos que figura más adelante.

Composiciones y Formulaciones Farmacéuticas

30 También se proporcionan en esta memoria composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, que comprenden una o más moléculas de la invención tal como se describe en la reivindicación 1, que se unen específicamente a TSLP, como el ingrediente activo.

Composiciones farmacéuticas incluyen típicamente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede incluir solución salina, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se formulan típicamente para que sean compatibles con su vía de administración pretendida. Por ejemplo, para la administración por inhalación, los compuestos se pueden suministrar en forma de un aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contenga un propulsor adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Métodos de este tipo incluyen los descritos en la Patente de EE.UU. N° 6.468.798.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria están formuladas para la administración que fija como objetivo el tracto respiratorio de un sujeto, especialmente el pulmón del sujeto. Una formulación de este tipo puede desviar el depósito del ingrediente activo en el tracto respiratorio superior del sujeto, minimizando con ello los problemas de tolerabilidad o seguridad asociados con el depósito del fármaco en la boca y la garganta. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria se formulan como una formulación de polvo seco. Una formulación de polvo seco de este tipo puede incluir el ingrediente activo, un excipiente formador de la envoltura, un excipiente formador de vidrio y un tampón.

Ingrediente Activo

Los ingredientes activos de las formulaciones de polvo seco pueden incluir uno o más de los fragmentos de anticuerpo anti-TSLP tal como se describen en esta memoria y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La cantidad de ingrediente activo en la formulación farmacéutica se puede ajustar para suministrar una cantidad terapéuticamente eficaz del ingrediente activo por dosis unitaria para lograr el resultado deseado. En la práctica, esto variará ampliamente dependiendo del ingrediente particular, de su actividad, de la gravedad de la afección a tratar, de la población de pacientes, de los requisitos de dosificación, del efecto terapéutico deseado y de las cantidades relativas de aditivos contenidos en la composición. La composición contendrá generalmente entre aproximadamente 1% en peso y aproximadamente 99% en peso del ingrediente activo, p. ej., aproximadamente 5% a aproximadamente 95%, aproximadamente 10% a aproximadamente 90%, aproximadamente 15% a 85%, aproximadamente 20% a 80%, aproximadamente 25% a 75%, aproximadamente 30% a 70%, aproximadamente 40% a 60% o aproximadamente 50% en peso del ingrediente activo. Las composiciones de la invención son particularmente útiles para ingredientes activos

que se suministran en dosis de 0,001 mg/día a 100 mg/día, preferiblemente en dosis de 0,01 mg/día a 75 mg/día, y más preferiblemente en dosis de 0,10 mg/día a 50 mg/día. Debe entenderse que se puede incorporar más de un ingrediente activo en las formulaciones descritas en esta memoria y que el uso de la expresión "ingrediente activo" no excluye de modo alguno el uso de dos o más de ingredientes activos de este tipo.

Excipientes

En algunas realizaciones, la formulación de polvo seco descrita en esta memoria contiene un excipiente formador de la envoltura hidrofóbico farmacéuticamente aceptable. Excipientes formadores de la envoltura son agentes tensioactivos que potencian la dispersabilidad de polvos secados por pulverización. El excipiente formador de la envoltura hidrofóbico puede adoptar diversas formas que dependerán al menos en cierta medida de la composición y del uso pretendido de la formulación de polvo seco. Excipientes hidrofóbicos farmacéuticamente aceptables adecuados pueden seleccionarse, en general, del grupo que consiste en fosfolípidos de cadena larga, aminoácidos y péptidos hidrofóbicos y jabones de ácidos grasos de cadena larga.

En algunas realizaciones, los excipientes formadores de la envoltura incluyen: glicina, alanina, valina, trileucina, dileucina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) y estearato de magnesio. En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria incluyen trileucina.

Mediante el control de la formulación y del procedimiento, es posible que la superficie de las partículas secadas por pulverización esté compuesta principalmente por el excipiente formador de la envoltura. Las concentraciones en superficie pueden ser mayores que 70%, tal como mayores que 75% u 80% u 85%. En algunas realizaciones, la superficie está compuesta por más de 90% de excipiente formador de la envoltura, o más del 95% o 98% o 99% de excipiente hidrofóbico. Para ingredientes activos potentes, no es raro que la superficie esté compuesta por más de 95% de excipiente formador de la envoltura.

En algunas realizaciones, el excipiente formador de la envoltura comprende más de 70% de la interfaz de partículas medida por espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA, también conocida como espectroscopía fotoelectrónica de rayos X o XPS), preferiblemente mayor que 90% o 95%.

En algunas realizaciones, el excipiente formador de la envoltura facilita el desarrollo de una morfología de partículas rugosa. Esto significa que la morfología de las partículas es porosa, arrugada, ondulada o arrugada en lugar de lisa. Esto significa que la superficie interior y/o exterior de las partículas de medicamento inhalable son al menos en parte rugosas. Esta rugosidad es útil para proporcionar una alta eficiencia de suministro, consistencia de la dosis y fijación de objetivo del fármaco al mejorar la fluidización y la dispersabilidad del polvo. Aumentos en la rugosidad de las partículas dan como resultado disminuciones de las fuerzas de cohesión entre partículas como resultado de la incapacidad de las partículas de acercarse al contacto de van der Waals. Las disminuciones en las fuerzas cohesivas son suficientes para mejorar drásticamente la fluidización y la dispersión del polvo en conjuntos de partículas rugosas.

Si está presente, el contenido del excipiente formador de la envoltura varía en general de aproximadamente 15 a 50% p/p del medicamento. Para trileucina se requiere un mínimo de aproximadamente 15% en la formulación para proporcionar un rendimiento aceptable como un formador de la envoltura. Para leucina, el contenido mínimo requerido es más alto, de aproximadamente 30%.

El uso de excipientes hidrofóbicos formadores de la envoltura tales como trileucina puede estar limitado por su solubilidad en el material de alimentación líquido. Típicamente, el contenido de trileucina en un polvo modificado por ingeniería genética es menos que 30% p/p, más a menudo del orden de 10% p/p a 20% p/p (aproximadamente 10-30% p/p). Debido a su limitada solubilidad en agua y su actividad superficial, la trileucina es un excelente formador de envolturas. La leucina también se puede utilizar como excipiente formador de la envoltura y realizaciones de la invención pueden comprender partículas que comprenden concentraciones de leucina de aproximadamente 50% a 75%.

Los jabones de ácidos grasos se comportan de manera similar a la leucina y la trileucina y, por lo tanto, son modificadores de la superficie adecuados.

Debido a la corta escala de tiempo del evento de secado, ingredientes activos que se disuelven en el material de alimentación estarán presentes generalmente en forma de sólidos amorfos en el producto de fármaco secado por pulverización.

La movilidad molecular de un sólido amorfo es significativa en comparación con la de su homólogo cristalino. La movilidad molecular comprende movimientos de largo alcance relacionados con la difusión molecular, así como movimientos locales tales como las rotaciones de enlaces. El principio central en la estabilización en estado sólido de materiales amorfos es que la movilidad molecular conduce a cambios físicos y químicos indeseables. Por lo tanto, las estrategias de formulación de materiales amorfos se centran habitualmente en la supresión de la movilidad molecular.

La existencia de una relación entre movilidad molecular e inestabilidad es intuitiva y conocida. Sin embargo, para que sea útil, la movilidad molecular debe definirse y entenderse cuidadosamente en términos de los tipos de movimientos presentes. Los movimientos moleculares de largo alcance surgen de la relajación estructural, conocida como relajación α . La escala de tiempo para movimientos de este tipo aumenta notablemente a medida que la temperatura desciende por debajo de la temperatura de transición vítrea (T_g) o, a la inversa, cuando la T_g se eleva a una temperatura de observación fija. Debido a que la estabilización de una molécula en un vidrio limita su movilidad molecular de largo alcance, ésta se ha convertido en la estrategia de formulación más común para la estabilización en estado sólido de fármacos amorfos.

El control de la estabilización vítrea de la movilidad molecular en el estado sólido, tal como mediante el uso de agentes formadores de vidrio, puede mejorar la estabilidad físico-química de la proteína en la formulación. Cuando se necesita un agente formador de vidrio, múltiples consideraciones regirán su selección. La función principal de un excipiente formador de vidrio es reducir la movilidad molecular general de largo alcance del fármaco. En la práctica, esto se logra elevando la temperatura de transición vítrea de la fase amorfa que contiene el fármaco. Aunque excipientes con valores altos de T_g son generalmente deseables, incluso un excipiente con una T_g moderada podría ser adecuado para algunas formulaciones (p. ej., fármacos con una T_g moderada o si la concentración de fármaco en la formulación es baja). Para orientar al formulador, conviene destacar las propiedades de un formador de vidrio ideal: un material biocompatible con una alta temperatura de transición vítrea que es miscible con el fármaco, formando una única fase amorfa que solo está débilmente plastificada por el agua.

En algunas realizaciones, la formulación de polvo seco descrita en esta memoria contiene un excipiente formador de vidrio. Excipientes formadores de vidrio que suprimen la movilidad molecular de largo alcance incluyen hidratos de carbono, aminoácidos y tampones. En algunas realizaciones, los excipientes formadores de vidrio incluyen: histidina, histidina HCl, sacarosa, trehalosa, manitol y citrato de sodio. Por lo tanto, a algunos excipientes, tales como histidina, se les puede aludir como un tampón o un excipiente formador de vidrio de forma indistinta. En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria, p. ej., las formulaciones de núcleo-envoltura, incluyen trehalosa.

La importancia de otros tipos de movimientos moleculares se ha vuelto cada vez más reconocida en la bibliografía farmacéutica. La nomenclatura (α , β , etc.) utilizada para designar los tipos de movimientos moleculares se origina en la espectroscopía dieléctrica de banda ancha. Los espectros de relajación dieléctrica se representan convencionalmente en una escala de frecuencia. Cuando se interpretan estos espectros, los picos de pérdida dieléctrica en las frecuencias más bajas se designan como movimientos α , los movimientos de frecuencia más alta como movimientos β , luego γ , y así sucesivamente. Por lo tanto, a los movimientos β y a otros que se producen a frecuencias más altas se les alude como movimientos "rápidos" o secundarios (y, en algunos casos, relajaciones de Johari-Goldstein). Aunque estas relajaciones secundarias se atribuyen a menudo a movimientos intramoleculares de diferentes restos moleculares (p. ej., cadenas laterales en una proteína), existen incluso para moléculas rígidas. En una imagen física simplista, los movimientos β se describen a veces como "traqueteo en la jaula" al azar de una especie atrapados entre sus vecinos más cercanos. En algún momento, los movimientos locales de los vecinos más cercanos proporcionan suficiente volumen libre para permitir un salto difusivo de las especies atrapadas. Este es un movimiento α . Por lo tanto, los movimientos β conducen a movimientos α .

Los movimientos secundarios son un área de investigación activa desde perspectivas tanto teóricas como prácticas. Y, aunque gran parte de la bibliografía se refiere a vidrios liofilizados o enfriados rápidamente en estado fundido, los principios también son relevantes para partículas amorfas modificadas por ingeniería para inhalación (p. ej., polvos fabricados utilizando secado por pulverización o ciertos otros procedimientos ascendentes). Se sospecha que la cristalización de moléculas pequeñas cerca de la T_g se debe a movimientos β . Los formuladores de proteínas han reconocido la importancia de controlar estos movimientos β . La supresión de los movimientos β en formulaciones amorfas se realiza típicamente con excipientes orgánicos pequeños, tales como glicerol, manitol, sorbitol y dimetilsulfóxido. Aunque estos son los excipientes descritos con más frecuencia para suprimir los movimientos β , otras moléculas orgánicas de bajo PM podrían servir para este propósito (p. ej., sales tampón o contraiones). Se plantea la hipótesis de que estos excipientes suprimen los movimientos de los dominios de alta movilidad aumentando la viscosidad local. Para el lector familiarizado con la vasta bibliografía sobre la estabilización vítrea, el uso de excipientes de este tipo puede parecer contradictorio. Estos y la mayoría de los otros materiales de bajo peso molecular tienen valores de T_g bajos y reducirán la T_g de una formulación, un fenómeno conocido como plastificación. Sin embargo, estos excipientes también pueden disminuir los movimientos β . Por lo tanto, se les alude como antiplastificantes o, en ocasiones, como plastificantes, dependiendo del punto de referencia; mientras plastifican los movimientos α , antiplastifican los movimientos β . Téngase en cuenta que esta terminología es una fuente potencial de confusión en la literatura; la designación de un material como un plastificante o un antiplastificante depende de si el punto de referencia de uno son los movimientos α o secundarios.

Debido a que la estabilización de proteínas en estado sólido requiere la formulación de una matriz vítrea, las contribuciones de los movimientos α y β son de particular interés. Aunque la bibliografía tiene numerosas referencias sobre el uso de agentes formadores de vidrio para estabilizar proteínas, hasta hace poco ha habido pocas referencias

específicas a la influencia de estos agentes en los movimientos locales. Aunque las temperaturas de transición vítrea de las proteínas son difíciles de medir, la mayoría de los datos sugieren que T_g es $> 150^\circ\text{C}$. Por lo tanto, los excipientes (p. ej., disacáridos tales como sacarosa o trehalosa) que se utilizan más comúnmente para estabilizar proteínas también plastificarán los movimientos α en la proteína (y antiplastificarán los movimientos secundarios). Un trabajo reciente ha demostrado que los movimientos β gobiernan en gran medida la estabilidad de las proteínas en los vidrios de azúcar. Por lo tanto, los disacáridos antiplastifican los movimientos β en las formulaciones de proteínas.

En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria comprenden excipientes formadores de vidrio con una temperatura de transición vítrea elevada ($> 80^\circ\text{C}$). En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria comprenden agentes formadores de vidrio, tales como sacarosa, trehalosa, manitol, fumaril dicetopiperazina y citrato de sodio.

Pueden utilizarse mezclas de agentes formadores de vidrio para lograr una estabilización óptima del sólido amorfo. Para las formulaciones de núcleo-envoltura de la 'plataforma', se utilizan en algunas realizaciones mezclas de trehalosa y manitol.

La cantidad de formador de vidrio requerida para lograr suprimir la movilidad molecular y lograr la estabilidad física y química dependerá de la naturaleza del agente activo. Para algunas realizaciones con proteínas secadas por pulverización, la relación molar de formador de vidrio a proteína puede estar en el intervalo de 300 a 900. Para moléculas pequeñas, la cantidad requerida de formador de vidrio dependerá de la T_g del agente activo.

En algunas realizaciones, la formulación de polvo seco descrita en esta memoria contiene un tampón. Los tampones son bien conocidos para el control del pH, tanto como un medio para suministrar un fármaco a un pH fisiológicamente compatible (es decir, para mejorar la tolerabilidad), como para proporcionar condiciones en solución favorables para la estabilidad química de un fármaco. En algunas formulaciones y procedimientos descritos en esta memoria, el pH del medio de un fármaco puede controlarse co-formulando el fármaco y el tampón juntos en la misma partícula.

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

Al igual que con un fármaco, los excipientes también se disuelven en la película de la superficie de agua adsorbida para formar una solución saturada. Esto se puede utilizar para el provecho del formulador para permitir el control del pH local en la capa adsorbida de humedad. Tampones o modificadores del pH, tales como histidina o fosfato, se utilizan comúnmente en formulaciones liofilizadas o secadas por pulverización para controlar la degradación química en solución y en estado sólido de las proteínas.

En algunas realizaciones, los tampones para la formulación incluyen: histidina, glicina, acetato y fosfato.

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

Formulación

En esta memoria se proporcionan formulaciones de polvo seco que comprenden partículas secadas por pulverización que derivan de manera efectiva el depósito en la orofaringe de un sujeto adulto medio, permitiendo el suministro fijado como objetivo de medicamento a los pulmones.

En algunas realizaciones, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria tienen una dosis pulmonar total (TLD) in vitro de entre 80 y 95% p/p de la dosis nominal, por ejemplo, entre 85 y 90% p/p para un sujeto adulto medio.

En algunas realizaciones, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria tienen una dosis pulmonar total (TLD) in vitro de entre 90 y 100% p/p de la dosis suministrada, por ejemplo, entre 90 y 95% p/p para un sujeto adulto medio.

- En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria comprenden la dosis suministrada que tiene adecuadamente un parámetro de inercia de entre 120 y 400 μm^2 L/min, por ejemplo entre 150 y 300 μm^2 L/min.
- 5 En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria comprenden partículas manipuladas que comprenden una superficie porosa, ondulada o rugosa. Partículas de este tipo exhiben fuerzas de cohesión entre partículas reducidas en comparación con los cristales de fármaco micronizados de un tamaño de partícula primaria comparable. Esto conduce a mejoras en la fluidización y dispersabilidad del polvo en relación con las mezclas ordenadas de fármaco micronizado y lactosa gruesa.
- 10 En algunas realizaciones, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria tienen una rugosidad superior a 1,5, por ejemplo de 1,5 a 20, de 3 a 15 o de 5 a 10.
- 15 Para algunos ingredientes farmacéuticos activos, p. ej., muchos péptidos o proteínas (p. ej., Fab anti-TSLP), se puede lograr una superficie rugosa mediante el secado por pulverización del fármaco puro. En tal caso, la formulación puede comprender fármaco puro, es decir, 100% p/p de agente activo o fármaco.
- En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria comprenden fármaco y tampón. La formulación puede comprender 70% a 99% p/p de fármaco o agente activo, y el resto es tampón.
- 20 En algunas realizaciones, las formulaciones descritas en esta memoria pueden comprender 0,1 a 99% p/p de agente activo, o 0,1 a 70% p/p de agente activo, o 0,1 a 50% p/p de ingrediente(s) activo(s) o 0,1 % a 30% p/p de ingrediente(s) activo(s).
- 25 En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria pueden incluir excipientes para potenciar adicionalmente la estabilidad o biocompatibilidad de la formulación. Por ejemplo, se contemplan diversas sales, tampones, antioxidantes, excipientes formadores de la envoltura y excipientes formadores de vidrio.
- 30 En algunas realizaciones, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria tienen un tamaño geométrico, expresado como un diámetro medio de masa (x_{50}) de entre 0,8 y 2,0 μm , por ejemplo de entre 1,0 y 1,5 μm .
- En algunas realizaciones, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria tienen un tamaño geométrico, expresado como x_{90} de entre 2,0 μm y 4,0 μm , por ejemplo entre 2,5 μm y 3,5 μm .
- 35 En algunas realizaciones, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria tienen una densidad compactada (ρ compactada) de entre 0,03 y 0,40 g/cm³, por ejemplo de entre 0,07 y 0,30 g/cm³.
- En algunas realizaciones, las partículas primarias de las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria tienen un tamaño aerodinámico (D_a) de entre 0,1 y 1,0 μm , por ejemplo entre 0,5 y 0,8 μm .
- 40 En algunas realizaciones, las partículas de las formulaciones de polvo seco descritas en esta memoria tienen un diámetro aerodinámico calculado de entre 0,5 y 1,2 μm , por ejemplo de entre 0,8 y 1,0 μm .
- 45 En algunas realizaciones, el conjunto de partículas de la formulación de polvo seco descrita en esta memoria presente en la dosis administrada tiene adecuadamente un diámetro aerodinámico medio de masa (MMAD) de entre 1,0 y 3,0 μm , por ejemplo de entre 1,5 y 2,0 μm .
- 50 En algunas realizaciones, la formulación de la presente divulgación contiene partículas que comprenden una envoltura y un núcleo: trileucina como formador de la envoltura presente en la superficie de la partícula, y un núcleo que comprende el ingrediente activo (p. ej., Fab anti-TSLP), trehalosa o trehalosa y manitol en combinación y un tampón.
- 55 En algunas realizaciones, la invención proporciona una formulación que comprende aproximadamente 40% (p/p) de molécula de unión a TSLP, p. ej., Fab1 anti-TSLP, aproximadamente 25% (p/p) de trileucina, aproximadamente 30% (p/p) de trehalosa y manitol combinados y aproximadamente 5% (p/p) de histidina. En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona una formulación que comprende aproximadamente 50% (p/p) de molécula de unión a TSLP, aproximadamente 15% (p/p) de trileucina, aproximadamente 2,6% (p/p) de HCl, aproximadamente 5,6% (p/p) de histidina y aproximadamente 26,8% (p/p) de trehalosa y una base combinadas; o aproximadamente 50% (p/p) de molécula de unión a TSLP, aproximadamente 15% (p/p) de trileucina, aproximadamente 19,4% (p/p) de trehalosa, aproximadamente 13% (p/p) de histidina y aproximadamente 2,6 % (p/p) de HCl.
- 60 En realizaciones adicionales, la presente solicitud describe una composición farmacéutica en polvo libre de soporte que comprende partículas que pueden suministrarse a partir de un inhalador de polvo seco, que comprende las moléculas anti-TSLP descritas en esta memoria, en donde una dosis pulmonar total in vitro es mayor que 90% de la dosis suministrada y en donde las partículas en la dosis suministrada tienen un parámetro de inercia entre 120 y 400 μm^2 L/min.

En otra realización, la presente solicitud describe una composición farmacéutica libre de soporte que se puede suministrar a partir de un inhalador de polvo seco, comprendiendo la composición una pluralidad de partículas, que comprende un núcleo que comprende una molécula anti-TSLP tal como se describe en esta memoria y al menos un excipiente formador de vidrio, y una envoltura que comprende un excipiente hidrofóbico y un tampón; y en donde la dosis pulmonar total in vitro es mayor que 90% p/p de la dosis suministrada. En algunas realizaciones, las partículas se forman mediante secado por pulverización. En otra realización, el excipiente hidrofóbico comprende trileucina.

En una realización adicional, la presente solicitud describe una composición farmacéutica libre de soporte que comprende una pluralidad de partículas primarias y aglomerados de partículas que se pueden suministrar de un inhalador de polvo seco, comprendiendo la composición una molécula anti-TSLP tal como se describe en esta memoria, y en donde una dosis pulmonar total (TLD) in vitro es mayor que 80% de una dosis nominal y en donde las partículas primarias se caracterizan por: una morfología ondulada; un diámetro aerodinámico mediano (Da) entre 0,3 y 1,0 μm ; y en donde las partículas y los aglomerados de partículas suministrados desde un inhalador de polvo seco tienen un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) entre 1,5 y 3,0 μm . En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende, además, un receptáculo para contener las partículas primarias, siendo el receptáculo adecuado para contener las partículas antes de su aerosolización dentro de un inhalador de polvo seco, y en donde el aerosol que comprende aglomerados respirables se forma tras dicha aerosolización.

En una realización adicional, la presente solicitud describe una formulación farmacéutica en polvo para el suministro pulmonar, comprendiendo el polvo partículas que comprenden: 1 a 100% en peso de una molécula anti-TSLP tal como se describe en esta memoria, en donde el polvo se caracteriza por una distribución del tamaño de partícula de al menos 50% entre 1 y 1,5 micras, una densidad de polvo de 0,05 a 0,3 g/cm³, un diámetro aerodinámico de menos de 2 micras, una rugosidad de 1,5 a 20; y en donde el polvo se administra por inhalación y proporciona una dosis pulmonar total in vitro mayor que 80%. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica en polvo está libre de soporte. En otras realizaciones, el polvo se envasa en un receptáculo para usar con un inhalador de polvo seco, y en donde cuando se aerosoliza utilizando dicho inhalador de polvo seco, el polvo se caracteriza por aglomerados respirables que tienen un diámetro aerodinámico mediano de masa de menos de aproximadamente 2 micras.

Procedimiento

En esta memoria se proporcionan también procedimientos para preparar formulaciones de polvo seco para inhalación que comprenden partículas secadas por pulverización, conteniendo la formulación al menos un ingrediente activo y teniendo una dosis pulmonar total (TLD) in vitro de entre 80 y 95% p/p, por ejemplo entre 85 y 90% p/p de la dosis nominal para un sujeto adulto medio.

En esta memoria se proporcionan también procedimientos para preparar formulaciones de polvo seco para inhalación que comprenden partículas secadas por pulverización, conteniendo la formulación al menos un ingrediente activo y teniendo una dosis pulmonar total (TLD) in vitro de entre 90 y 100% p/p, por ejemplo entre 90 y 95% p/p de la dosis suministrada para un sujeto adulto medio.

En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco contienen al menos un ingrediente activo que es adecuado para tratar enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias, particularmente asma y/o COPD, p. ej., Fabs anti-TSLP. En algunas realizaciones, las formulaciones de polvo seco contienen al menos un ingrediente activo que es adecuado para el tratamiento no invasivo de enfermedades en la circulación sistémica.

El secado por aspersión confiere ventajas en la producción de partículas diseñadas para inhalación, tal como la capacidad de producir rápidamente un polvo seco y controlar los atributos de las partículas, incluyendo el tamaño, la morfología, la densidad y la composición de la superficie. El proceso de secado es muy rápido (del orden de milisegundos). Como resultado, la mayoría de los ingredientes activos que se disuelven en la fase líquida precipitan como sólidos amorfos, ya que no tienen tiempo suficiente para cristalizar.

El secado por pulverización comprende cuatro operaciones unitarias: preparación del material de alimentación, atomización del material de alimentación para producir gotitas del tamaño de una micra, secado de las gotitas en un gas caliente y recogida de las partículas secas con un filtro mangas o un separador ciclónico.

En algunas realizaciones, los procedimientos para hacer partículas de polvo seco comprenden tres etapas, sin embargo, en algunas realizaciones, dos o incluso las tres de estas etapas se pueden llevar a cabo de manera sustancialmente simultánea, por lo que en la práctica el procedimiento puede considerarse de hecho como un procedimiento de una sola etapa. Únicamente con el fin de describir el procedimiento de la presente invención, las tres etapas se describirán por separado, pero dicha descripción no pretende limitarse a un procedimiento de tres etapas.

En algunas realizaciones, el procedimiento incluye preparar un material de alimentación en solución y secar por pulverización el material de alimentación para proporcionar partículas de polvo seco activas. El material de alimentación comprende al menos un ingrediente activo disuelto en un material de alimentación líquido de base acuosa. En algunas

realizaciones, el material de alimentación comprende al menos un ingrediente activo (p. ej., Fab1 anti- TSLP) disuelto en un material de alimentación de base acuosa que comprende un co-disolvente añadido. En algunas realizaciones, el material de alimentación comprende al menos un agente activo disuelto en un material de alimentación de etanol/agua, en donde la fracción de etanol está entre 5% y 30% p/p, por ejemplo entre 5% y 20% p/p.

Para los sólidos amorfos, es importante controlar el contenido de humedad del fármaco. Para los fármacos que no son hidratos, el contenido de humedad en el polvo es preferiblemente menor que 5%, más típicamente menor que 3% o incluso 2% p/p. Sin embargo, el contenido de humedad debe ser lo suficientemente alto como para garantizar que el polvo no exhiba fuerzas de atracción electrostáticas significativas. El contenido de humedad en los polvos secados por pulverización puede determinarse mediante valoración de Karl Fischer.

En algunas realizaciones, el material de alimentación se pulveriza en una corriente de aire filtrado caliente que evapora el disolvente y transporta el producto secado a un colector. A continuación, el aire gastado se expulsa con el disolvente. Las condiciones de funcionamiento del secador por pulverización, tales como la temperatura de entrada y salida, la velocidad de alimentación, la presión de atomización, el caudal del aire de secado y la configuración de la boquilla se pueden ajustar con el fin de producir el tamaño de partícula requerido, el contenido de humedad y el rendimiento de producción de las partículas secas resultantes. La selección del aparato apropiado y las condiciones de procesamiento están dentro del alcance de un experto en la materia a la vista de las enseñanzas de esta memoria y se pueden lograr sin una experimentación excesiva. Ajustes ejemplares para un secador de incrustaciones NIRO® PSD-1® son los siguientes: una temperatura de entrada de aire entre aproximadamente 80°C y aproximadamente 200°C, tal como entre 110°C y 170°C; una salida de aire entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 120°C, tal como aproximadamente 60°C y 100°C; una velocidad de alimentación de líquido entre aproximadamente 30 g/min y aproximadamente 120 g/min, tal como aproximadamente 50 g/min y 100 g/min; un flujo de aire total de aproximadamente 140 pies cúbicos estándar por minuto (scfm) (0,066 metros cúbicos por segundo) a aproximadamente 230 scfm (0,11 metros cúbicos por segundo), tal como aproximadamente 160 scfm (0,07 metros cúbicos por segundo) a 210 scfm (0,10 metros cúbicos por segundo); y un caudal de aire de atomización entre aproximadamente 30 scfm (0,01 metros cúbicos por segundo) y aproximadamente 90 scfm (0,04 metros cúbicos por segundo), tal como aproximadamente 40 scfm (0,02 metros cúbicos por segundo) a 80 scfm (0,038 metros cúbicos por segundo). El contenido de sólidos en el material de alimentación secado por pulverización estará típicamente en el intervalo de 0,5% p/v (5 mg/ml) a 10% p/v (100 mg/ml), tal como 1,0% p/v a 5,0% p/v. Los ajustes, por supuesto, variarán dependiendo de la escala y del tipo de equipo utilizado, y de la naturaleza del sistema disolvente empleado. En cualquier caso, el uso de estos y métodos similares permite la formación de partículas con diámetros apropiados para la deposición de aerosoles en el pulmón.

En algunas realizaciones, todos los excipientes se disuelven en el material de alimentación, y los recubrimientos núcleo-envoltura del ingrediente activo dispersado son impulsados por diferencias en las propiedades físicas de los solutos disueltos.

Como se comentó previamente para las partículas que comprenden un ingrediente activo amorfo, la naturaleza de la superficie y la morfología de las partículas se controlarán controlando la solubilidad y la difusividad de los componentes dentro del material de alimentación. Excipientes hidrofóbicos tensioactivos (p. ej., trileucina, fosfolípidos, jabones de ácidos grasos) se pueden concentrar en la interfaz, mejorando la fluidización y dispersabilidad del polvo, al tiempo que aumentan la rugosidad de la superficie de las partículas.

Cualquier etapa de secado por pulverización y/o todas las etapas de secado por pulverización se pueden llevar a cabo utilizando un equipo convencional utilizado para preparar partículas secadas por pulverización para su uso en productos farmacéuticos que se administran por inhalación. Secadores por pulverización disponibles comercialmente incluyen los fabricados por Büchi Ltd. y Niro Corp.

En algunas realizaciones, el material de alimentación se atomiza con una boquilla de fluido gemela. Se produce un ensanchamiento significativo de la distribución del tamaño de partícula de las gotitas de líquido por encima de la carga de sólidos de aproximadamente 1,5% p/p. Las gotitas de mayor tamaño en la cola de la distribución dan como resultado partículas más grandes en la distribución de polvo correspondiente. Como resultado, algunas realizaciones con boquillas de fluido gemelas restringen la carga de sólidos al 1,5% p/p o menos, tal como 1,0% p/p o 0,75% p/p.

En algunas realizaciones, se pueden lograr distribuciones del tamaño de gotita estrechas con atomizadores de película plana tal como se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N°s 7.967.221 y 8.616.464 con cargas de sólidos más altas. En algunas realizaciones, el material de alimentación se atomiza a una carga de sólidos entre 2% y 10% p/p, tal como 3% y 5% p/p.

En algunas realizaciones, la densidad de población de partículas o PPD está entre $0,01 \times 10^{-6}$ y $1,0 \times 10^{-6}$, tal como entre $0,03 \times 10^{-6}$ y $0,2 \times 10^{-6}$.

En algunas realizaciones, la relación EtOH/sólidos está entre 1,0 y 20,0, tal como entre 3,0 y 10,0.

En algunas realizaciones, la presente solicitud describe una formulación de polvo farmacéutica para inhalación que comprende partículas hechas por un procedimiento que comprende:

a. preparar una solución del fragmento de anticuerpo de unión anti-TSLP descrito en esta memoria en una mezcla de agua/etanol, en donde el etanol está presente entre 1 y 20% y una relación de etanol a sólidos totales está entre 1 y 20;

b. secar por pulverización la solución para obtener materiales en partículas, en donde los materiales en partículas se caracterizan por una densidad de partículas de 0,2 g/cm³ o menos, un diámetro geométrico de 1-3 micras y un diámetro aerodinámico de 1 a 2 micras;

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

En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica en polvo, la densidad de población de partículas está entre 0,01 x 10⁻⁶ y 1,0 x 10⁻⁶.

La presente solicitud también describe un método para suministrar a los pulmones de un sujeto partículas que comprenden un polvo seco, comprendiendo el método:

a. preparar una solución del fragmento de anticuerpo de unión anti-TSLP descrito en esta memoria en una mezcla de agua/etanol, en donde el etanol está presente entre 5 y 20%;

b. secar por pulverización la solución para obtener materiales en partículas, en donde los materiales en partículas se caracterizan por una densidad de partículas de entre aproximadamente 0,05 y 0,3 g/cm³, un diámetro geométrico de 1-3 micras y un diámetro aerodinámico de 1-2 micras;

c. envasar el polvo secado por pulverización en un receptáculo;

d. proporcionar un inhalador que tiene medios para extraer el polvo para el receptáculo, teniendo el inhalador, además,, medios de fluidización y aerosolización del polvo, pudiendo ser hecho funcionar el inhalador con un esfuerzo de inspiración impulsado por el paciente de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 kPa; proporcionando el inhalador y el polvo juntos un parámetro de inercia de entre aproximadamente 120 y 400 μm² L/min y en el que el polvo, cuando se administra por inhalación, proporciona al menos 90% de deposición pulmonar.

La presente solicitud también describe un método para preparar una formulación de medicamento en polvo seco para administración pulmonar, comprendiendo el método

a. preparar una solución del fragmento de anticuerpo de unión anti-TSLP descrito en esta memoria en una mezcla de agua/etanol, en donde el etanol está presente entre 5 y 20%;

b. secar por pulverización la solución para obtener materiales en partículas, en donde los materiales en partículas se caracterizan por una densidad de partículas de entre aproximadamente 0,05 y 0,3, un diámetro geométrico de 1-3 micras y un diámetro aerodinámico de 1-2 micras.

En una realización adicional, la presente solicitud describe una composición farmacéutica en polvo que se puede administrar a partir de un inhalador de polvo seco, que comprende partículas que comprenden las moléculas de unión anti-TSLP descritas en esta memoria, en donde una dosis pulmonar total in vitro es superior al 90% p/p de la dosis suministrada, y en donde la composición comprende al menos una característica de estar libre de soporte, una densidad de partículas de 0,05 a 0,3 g/cm³; una rugosidad de partícula de 3 a 20; partículas hechas mediante un procedimiento que comprende secar por pulverización a partir de una mezcla de etanol:agua; y partículas hechas mediante un procedimiento que comprende secar por pulverización a partir de una mezcla de etanol:agua que tiene una relación de etanol:sólidos de entre 1 y 20. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica en polvo comprende al menos dos de las características; en otras realizaciones, la composición farmacéutica en polvo comprende al menos tres de las características.

Dosificación

Dosificación, toxicidad y eficacia terapéutica de las moléculas anti-TSLP descritas en esta memoria, incluyendo composiciones farmacéuticas que comprenden fragmentos anti-TSLP, se pueden determinar mediante procesos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL50/DE50. Se desean compuestos que exhiban altos índices terapéuticos. Si bien se pueden utilizar compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de suministro que fije como objetivo compuestos de este tipo al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, con ello, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de compuestos de este tipo se encuentra preferiblemente dentro

de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición de síntomas semimáxima) según se determina en cultivo celular. Una información de este tipo se puede utilizar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Kits

También se proporcionan en esta memoria kits que incluyen una o más de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en esta memoria, un dispositivo para suministrar la composición farmacéutica a un sujeto e instrucciones de uso. En algunas realizaciones, el dispositivo puede suministrar la composición farmacéutica en forma de un aerosol. En algunas realizaciones, el dispositivo es un inhalador, p. ej., un inhalador de polvo seco (DPI). En otras realizaciones, el dispositivo puede ser un inhalador de dosis medida o un nebulizador.

Inhaladores de polvo seco adecuados incluyen los inhaladores de dosis unitaria, en los que el polvo seco se almacena en una cápsula o blister, y el paciente carga una o más de las cápsulas o blísteres en el dispositivo antes de su uso. Alternativamente, se contemplan inhaladores de polvo seco multidosis en los que la dosis se envasa previamente en blísteres de papel de aluminio, por ejemplo, en un cartucho, tira o rueda.

Inhaladores de polvo seco incluyen inhaladores de polvo seco multidosis, tales como DISKUS™ (GSK, descrito en la Patente de EE.UU. 6536427), DISKHALER™ (GSK, descrito en la Publicación de Solicitud de Patente WO 97/25086), GEMINI™ (GSK, descrito en la Publicación de Solicitud de Patente WO 05/14089), GYROHALER™ (Vectura, descrito en la Publicación de Solicitud de Patente WO 05/37353) y PROHALER™ (Valois, descrito en la Publicación de Solicitud de Patente WO 03/77979).

Inhaladores de polvo seco de dosis única incluyen AEROLIZER™ (Novartis, descrito en el documento US 3.991.761) y BREEZHALER™ (Novartis, descrito en la Patente de EE.UU. N° 8479730 (Ziegler et al.)). Otros inhaladores de dosis única adecuados incluyen los descritos en Patentes de EE.UU. N°s 8069851 y 7559325.

Los inhaladores de blíster de dosis unitaria, que algunos pacientes encuentran más fáciles y más convenientes de utilizar para suministrar medicamentos que requieren la administración una vez al día, incluyen el inhalador descrito en la Patente de EE.UU. N° 8573197 (Axford et al.).

En algunas realizaciones, los inhaladores son inhaladores de polvo seco multidosis en los que el paciente suministra la energía para fluidificar y dispersar el polvo (es decir, MD-DPI "pasivos"). Los polvos de la presente invención fluidizan y dispersan eficazmente a caudales inspiratorio pico (PIF) bajos. Como resultado, los pequeños cambios en la dispersión del polvo con PIF observados equilibran eficazmente los aumentos en la impactación inercial que se producen con los aumentos en PIF, conduciendo a la deposición pulmonar independiente del caudal. La ausencia de dependencia del caudal observada para los polvos de la presente invención impulsa reducciones en la variabilidad global entre pacientes.

Instrucciones de uso puede incluir instrucciones para el diagnóstico o el tratamiento de condiciones inflamatorias relacionadas con la TSLP. Los kits que se proporcionan en esta memoria se pueden utilizar de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta memoria. Los expertos en la técnica conocerán otros usos adecuados para los kits proporcionados en esta memoria y serán capaces de emplear los kits para usos de este tipo. Los kits que se proporcionan en esta memoria también pueden incluir un envío postal (p. ej., un sobre con franqueo pagado o un paquete de envío) que se puede utilizar para devolver la muestra para su análisis, p. ej., a un laboratorio. El kit puede incluir uno o más recipientes para la muestra, o la muestra puede estar en un vial de recogida de sangre estándar. El kit también puede incluir uno o más de un formulario de consentimiento informado, un formulario de solicitud de ensayo e instrucciones sobre cómo utilizar el kit en un método descrito en esta memoria. Métodos para utilizar kits de este tipo también se incluyen en esta memoria. Uno o más de los formularios (p. ej., el formulario de solicitud de ensayo) y el recipiente que contiene la muestra pueden codificarse, por ejemplo, con un código de barras para identificar al sujeto que proporcionó la muestra.

Usos médicos

En esta memoria se proporcionan las moléculas de unión a TSLP descritas en esta memoria, o composiciones farmacéuticas para su uso como un medicamento, p. ej., para su uso en el tratamiento de una afección relacionada con la TSLP en un sujeto que necesita su tratamiento, p. ej., un ser humano, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las moléculas de unión a TSLP descritas en esta memoria, o composiciones farmacéuticas de las mismas. En algunas realizaciones, usos de este tipo incluyen, además, identificar y seleccionar un sujeto que necesite tratamiento de una afección inflamatoria relacionada con la TSLP. La invención también proporciona

el uso de moléculas de unión a TSLP tal como se describe en esta memoria, o composiciones farmacéuticas de las mismas, para tratar o prevenir enfermedades en un paciente. En algunas realizaciones, la invención proporciona moléculas de unión a TSLP tal como se describe en esta memoria, o composiciones farmacéuticas de las mismas, para su uso en el tratamiento o la prevención de enfermedades en un paciente. En realizaciones adicionales, la invención proporciona el uso de moléculas de unión a TSLP tal como se describe en esta memoria, o composiciones farmacéuticas de las mismas, en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un paciente.

En algunas realizaciones, las afecciones inflamatorias relacionadas con TSLP pueden desencadenarse por reacciones alérgicas o irritantes o estimulantes ambientales. En algunas realizaciones específicas, la afecciones inflamatorias relacionadas con TSLP incluyen asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rinitis alérgica, rinosinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, esofagitis eosinofílica.

En algunas realizaciones, las moléculas de unión a TSLP o composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a TSLP se administran al sujeto mediante inhalación, p. ej., en forma de aerosol mediante un inhalador de polvo seco. En otras realizaciones, las moléculas de unión a TSLP o las composiciones farmacéuticas pueden administrarse utilizando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración seleccionadas incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Alternativamente, las moléculas de unión a TSLP, o composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de unión a TSLP de la invención, se pueden administrar mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

En algunas realizaciones, la afección inflamatoria relacionada con TSLP es el asma. El asma es una enfermedad inflamatoria crónica compleja y heterogénea de las vías respiratorias que se caracteriza por una broncoconstricción reversible y se asocia con una respuesta exagerada de las vías respiratorias a una amplia gama de estímulos broncoconstrictores (hiperreactividad de las vías respiratorias; AHR). El trabajo reciente se ha centrado en identificar las vías inmunitarias implicadas en la patogénesis del asma y ha revelado funciones para las células efectoras T cooperadoras tipo 2 (Th2) y no mediadas por Th2 (Lambrecht y Hammad, *Nature immunology* 2014, 16: 45-56). En el caso del asma alérgica, que se caracteriza por inflamación eosinofílica y evidencia de atopia, los elementos de la vía inmunitaria Th2 son cruciales en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación de las vías respiratorias y AHR. La linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es un regulador clave aguas arriba de la respuesta Th2. La TSLP se expresa en las células epiteliales de la mucosa dentro de las vías respiratorias en respuesta a diversos estímulos (p. ej., lesión física, materia en partículas ambiental, alérgenos, citoquinas proinflamatorias o polarizadoras de Th2 y productos microbianos). El papel de la TSLP es modular las células dendríticas (DC) e inducir la diferenciación de células T naíf en células Th2 inflamatorias y fomentar la secreción de citoquinas de mastocitos, eosinófilos y macrófagos como parte de la respuesta inmune innata. Además, la TSLP puede interferir con el desarrollo de las células T reguladoras, alterando el equilibrio entre la tolerancia y la inflamación. En el caso del asma no alérgica, caracterizada por inflamación neutrofílica o paucigranulocítica, las citoquinas que impulsan la inflamación no se comprenden bien, sin embargo, se cree que juegan un papel las citoquinas IL-17 e interferón- γ (IFN- γ) no mediadas por Th2. Curiosamente, además de su papel en la mediación de la respuesta Th2, la evidencia preclínica sugiere que la TSLP amplifica las respuestas no Th2 y también puede ser importante para establecer la inflamación crónica mediada por IL-17 e IFN- γ .

La TSLP es tanto necesaria como suficiente para el desarrollo de la inflamación asociada a la citoquina Th2 de las vías respiratorias en roedores. Ratones transgénicos con secreción epitelial pulmonar constitutiva de TSLP, bajo el control del promotor de la proteína C tensioactivo, desarrollaron las siguientes características compatibles con el asma: inflamación eosinofílica de las vías respiratorias; expresión de infiltración de células T CD4 sesgada por Th2; eosinofilia sistémica; IgE incrementada; hipersensibilidad de las vías respiratorias; y remodelación significativa de las vías respiratorias, incluyendo hiperplasia de células caliciformes y fibrosis vascular y de las vías respiratorias. Respaldando adicionalmente el papel de TSLP en la inflamación alérgica, también se encuentra que la expresión de TSLP y la producción de proteínas aumentan tras la exposición al alérgeno inhalado en el pulmón (Zhou et al., 2005, *Nature immunology* 6, 1047-1053), mientras que el suministro intranasal directo de TSLP en presencia de antígeno conduce a la aparición rápida de una enfermedad grave (Headley et al., 2009, *Journal of immunology* 182, 1641-1647). Los ratones con deficiencia de TSLPR son resistentes al desarrollo de inflamación tipo Th2 en el modelo clásico de cebado de ovoalbúmina más alumbre en ratones (Al-Shami et al., 2005, *The Journal of experimental medicine* 202, 829-839; Zhou et al., 2005, *Nature immunology* 6, 1047-1053). La disminución de la inflamación de las vías respiratorias se correlacionó con una reducción de la IgE sérica y una disminución de las citoquinas Th2 y quimioquinas, tales como IL-4, -5, -13, eotaxina y quimioquina regulada y activada del timo (TARC).

Se observó un aumento de la expresión de TSLP en la lámina propia de las vías respiratorias específicamente en pacientes con asma grave (Shikotra et al., 2012, Journal of Allergy and Clinical Immunology 129, 104-111.e109). Además, varios estudios han demostrado una asociación entre la frecuencia de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el locus TSLP humano y los niveles de expresión de TSLP y la susceptibilidad a la enfermedad para el asma y la esofagitis eosinofílica (Ferreira et al., 2014, The Journal of allergy and clinical immunology 133, 1564-1571; Harada et al., 2011, American journal of respiratory cell and molecular biology 44, 787-793; He et al., 2009, The Journal of allergy and clinical immunology 124, 222-229; Rothenberg et al., 2010, Nature Genetics 42, 289-291). En un estudio reciente, también se encontró que las variantes del gen TSLP estaban asociadas con un aumento significativo en el riesgo de asma en el asma infantil a través de asociaciones epistáticas (Biagini Myers et al., 2014, The Journal of allergy and clinical immunology 134, 891-899 e893).

Terapias de Combinación

Los diversos tratamientos arriba descritos se pueden combinar con otros participantes en el tratamiento, tales como el patrón actual de cuidado para afecciones inflamatorias relacionadas con la TSLP. Por consiguiente, los usos para el tratamiento de una afección inflamatoria relacionada con la TSLP descrita en esta memoria puede incluir, además, administrar un segundo agente al sujeto en necesidad de tratamiento. En algunas realizaciones, el segundo agente puede seleccionarse de, pero no se limita a corticosteroides, broncodilatadores (SABA, LABA, SAMA, LAMA), antihistamínicos, antileucotrienos e inhibidores de PDE-4.

El término «combinación» se refiere a una combinación fija en una forma de unidad de dosificación, o una administración combinada, en donde un compuesto de la presente invención y un participante en la combinación (p. ej., otro fármaco como se explica más adelante, también denominado "agente terapéutico" o "co-agente") puede administrarse de forma independiente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los participantes en la combinación muestren un efecto cooperativo, p. ej., sinérgico. Los componentes individuales se pueden envasar en un kit o por separado. Uno o ambos componentes (p. ej., polvos o líquidos) pueden reconstituirse o diluirse a una dosis deseada antes de la administración. El término "coadministración" o la expresión "administración combinada" o similares, tal como se utilizan en esta memoria, pretenden abarcar la administración del participante en la combinación seleccionado a un solo sujeto que lo necesita (p. ej., un paciente), y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes no se administran necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo. La expresión "combinación farmacéutica", tal como se utiliza en esta memoria, significa un producto que resulta de mezclar o combinar más de un agente terapéutico e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los agentes terapéuticos. La expresión "combinación fija" significa que los agentes terapéuticos, p. ej., un compuesto de la presente invención y un participante en la combinación, se administran simultáneamente a un paciente en forma de una única entidad o dosis. La expresión "combinación no fija" significa que los agentes terapéuticos, p. ej., un compuesto de la presente invención y un participante en la combinación, se administran ambos a un paciente como entidades separadas de forma simultánea, concurrente o secuencial sin límites de tiempo específicos, en donde una administración de este tipo proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Esto último también se aplica a la terapia de cóctel, p. ej., la administración de tres o más agentes terapéuticos. La expresión "combinación farmacéutica", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una combinación fija en una forma de unidad de dosificación, o una combinación no fija o un kit de partes para la administración combinada en la que se pueden administrar dos o más agentes terapéuticos de forma independiente al mismo tiempo o por separado dentro de intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los participantes en la combinación muestren un efecto cooperativo, p. ej., sinérgico.

La expresión "terapia de combinación" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico descrito en la presente divulgación. Una administración de este tipo comprende la coadministración de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una sola cápsula que tiene una relación fija de ingredientes activos. Alternativamente, una administración de este tipo incluye la coadministración en múltiples o en recipientes separados (p. ej., tabletas, cápsulas, polvos y líquidos) para cada uno de los ingredientes activos. Los polvos y/o líquidos pueden reconstituirse o diluirse a una dosis deseada antes de la administración. Además, una administración de este tipo también incluye el uso de cada tipo de agente terapéutico de manera secuencial, aproximadamente al mismo tiempo o en momentos diferentes. En cualquier caso, el régimen de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación de fármacos en el tratamiento de las afecciones o los trastornos descritos en esta memoria.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria para poner en práctica la invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Un experto en la técnica reconocerá métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria que podrían utilizarse en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita en modo alguno a los métodos y materiales descritos.

Ejemplos

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

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

Inmunoadsorción

Se realizaron tres tipos de inmunoadsorción: inmunoadsorción en fase sólida contra TSLP humana recombinante directamente revestida (rhTSLP), inmunoadsorción de captura de proteína precursora amiloide (APP) en fase sólida e inmunoadsorción en solución contra TSLP.

Para la inmunoadsorción en fase sólida contra rhTSLP directamente recubierta, las placas Maxisorp™ de 96 pocillos se recubrieron con 300 µl de rhTSLP derivada de *E.coli* (R&D Systems) por pocillo a 4°C durante la noche. Para cada una de las inmunoadsorciones se añadieron aproximadamente 4×10^{13} anticuerpos de fago HuCAL PLATINUM® a cada uno de los antígenos recubiertos y se incubaron durante 2 h a TA en un agitador de placas de microtitulación. Posteriormente, los fagos unidos de forma no específica se lavaron mediante varias etapas de lavado y los fagos unidos específicamente se eluyeron utilizando DTT 25 mM en Tris/HCl 10 mM pH 8. El material eluido de DTT se transfirió a 14 ml de TG1 de *E. coli* y se incubó para la infección por fagos.

Las bacterias infectadas se resuspendieron en medio 2xYT, se sembraron en placas de agar LB/Cam y se incubaron durante la noche. Se rasparon las colonias de las placas y se utilizaron para el rescate de fagos, la amplificación policlonal de clones seleccionados y la producción de fagos. Con el fago purificado se inició la siguiente ronda de inmunoadsorción. La segunda y tercera ronda de inmunoadsorción en fase sólida se realizaron de acuerdo con el protocolo de la primera ronda, excepto por cantidades disminuidas de antígeno y condiciones de lavado más estrictas.

En la inmunoadsorción de captura de APP en fase sólida contra TSLP de Cyno, los antígenos utilizados en la inmunoadsorción tenían una etiqueta APP6 (proteína precursora de amiloide), y las proteínas de fusión antígeno-APP6 se capturaron *vía* un anticuerpo anti-APP6 de ratón que está inmovilizado en una placa Maxisorp™. Para evitar la selección de la unión del fago a la etiqueta APP6 del antígeno o al anticuerpo de captura anti-APP6, se realizó un bloqueo previo del fago utilizando el anticuerpo de captura y un antígeno etiquetado con APP6 irrelevante.

Las placas Maxisorp™ de 96 pocillos se recubrieron con 300 µl de anticuerpo anti-APP y antígeno etiquetado con APP6 irrelevante durante la noche a 4°C. El antígeno TSLP_Avi-APP6 humano o TSLP_APP6-Avi de cyno se capturaron durante 1 h a TA en un agitador. En paralelo, los fagos se pre-adsorbieron dos veces en el anticuerpo anti-APP y en el antígeno irrelevante.

Además de los procesos de recubrimiento de antígeno y bloqueo de fagos, la inmunoadsorción de captura se realizó como la inmunoadsorción en fase sólida arriba descrita.

Para la inmunoadsorción en solución contra TSLP, los fagos se bloquearon con suero humano al 50%/bloqueador químico 0,33x/Tween20 al 0,05%. Por grupo de fagos, se bloquearon 4 mg de perlas de estreptavidina (Dynabeads® M-280 Streptavidin; Invitrogen) en 1x Chemiblocker. Para la eliminación del fago de unión a estreptavidina o perlas, se realizó la pre-adsorción de las partículas de fago bloqueadas dos veces utilizando cada una de las perlas de estreptavidina bloqueadas. A continuación, se añadió el antígeno TSLP_Avi-APP6 humano biotinilado a las partículas de fago. Después de la incubación, los complejos fago-antígeno se capturaron utilizando perlas de estreptavidina y las partículas de fago unidas a las perlas de estreptavidina se recogieron con un separador magnético. Los fagos unidos de forma no específica se separaron por lavado mediante varias etapas de lavado utilizando PBS/Tween20 al 0,05% y PBS. Los fagos unidos de forma específica se eluyeron de perlas de estreptavidina utilizando DTT 25 mM en Tris/HCl 10 mM pH 8. La posterior infección de fagos y producción de fagos se realizaron de acuerdo con el protocolo de Inmunoadsorción en Fase Sólida y se inició la siguiente ronda de inmunoadsorción.

Expresión

Para facilitar la expresión rápida de Fab soluble, las inserciones que codifican Fab del fago HuCAL PLATINUM® seleccionado se subclonaron a partir del vector de presentación pMORPH®30 en el vector de expresión pMORPH®x11 pMORPH®x11_FH. Después de la transformación de TG1-F de *E. coli*, se realizó la expresión de un solo clon y la preparación de extractos periplásmicos que contenían fragmentos HuCAL®-Fab como se describió previamente (Rauchenberger et al., 2003, J Biol Chem 278: 38194-38205).

Se recogieron clones individuales resistentes al cloranfenicol en los pocillos de una placa de microtitulación de 384 pocillos estéril precargada con medio 2xYT y se cultivaron durante la noche a 37°C. A la mañana siguiente, se añadió medio que contenía glicerol a cada uno de los pocillos de las placas maestras; las placas se sellaron con papel de aluminio y se almacenaron a -80°C.

Rastreo ELISA

Utilizando el rastreo ELISA, se identifican clones Fab individuales a partir de la salida de la inmuoadsorción para unirse al antígeno diana. Los Fabs se testan utilizando lisados crudos de *E. coli* que contienen Fab. Para la verificación de la expresión de Fab en los lisados de *E. coli* preparados, se recubrieron placas Maxisorp™ de 384 pocillos con IgG anti-humana de oveja específica para el fragmento Fd diluida 1:1000 en PBS. Después de bloquear con leche desnatada en polvo al 5% en PBS que contenía Tween20 al 0,05%, se añadieron lisados de *E. coli* que contenían Fab. Posteriormente, los fragmentos HuCAL®-Fab unidos se detectaron mediante incubación con IgG anti-humana de cabra específica para F(ab)2 conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000), seguida de la adición de sustrato de fluorescencia AttoPhos (Roche, nº 11681982001). Se registró la emisión de fluorescencia a 535 nm con excitación a 430 nm.

Para realizar el rastreo ELISA en antígeno revestido directamente, se revisitaron placas Maxisorp™ de 384 pocillos con diferentes antígenos de TSLP a una concentración de 2 µg/ml en PBS. Después de bloquear las placas con leche desnatada en polvo al 5% en PBS, se añadieron lisados de *E. coli* que contenían Fab. La unión de Fab se detectó mediante IgG anti-humana de cabra específica para F(ab)2 conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000) utilizando sustrato de fluorescencia Attophos (Roche, nº 11681982001). Se registró la emisión de fluorescencia a 535 nm con excitación a 430 nm.

Para realizar el rastreo ELISA en el antígeno capturado por APP, se recubrieron placas Maxisorp™ de 384 pocillos con anticuerpo específico anti-APP a una concentración de 2,5 µg/ml en PBS. Después de bloquear las placas con leche desnatada en polvo al 5% en PBS, se dejó que los antígenos de TSLP marcados con APP a una concentración de 2 µg/ml se unieran durante 1 hora a TA. Luego se añadieron lisados de *E. coli* que contenían Fab. La unión de Fab se detectó mediante IgG anti-humana de cabra específica para F(ab)2 conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000) utilizando sustrato de fluorescencia Attophos (Roche, nº 11681982001). Se registró la emisión de fluorescencia a 535 nm con excitación a 430 nm.

Para realizar el rastreo ELISA de antígeno biotinilado, se recubrieron placas Maxisorp™ de 384 pocillos con IgG anti-humana de oveja específica para el fragmento Fd (El sitio de unión, nº PC075) diluido 1:1000 en PBS o IgG de ratón específica anti-His (R&D Systems, nº MAB050) respectivamente. Después de bloquear con leche desnatada en polvo al 5% en PBS, se añadieron lisados de *E. coli* que contenían Fab. Posteriormente, se permitió que los fragmentos de HuCAL®-Fab capturados se unieran a 0,7 - 1,5 µg/ml de hu TSLP biotinilada, hu TSLP o cy TSLP, respectivamente, que se detectó mediante incubación con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, seguida de la adición de sustrato de fluorescencia AttoPhos (Roche, nº 11681982001). Se registró la emisión de fluorescencia a 535 nm con excitación a 430 nm.

También se capturaron antígenos biotinilados (2,5 - 5 µg/ml) en placas recubiertas con neutravidina. Después de bloquear con leche desnatada en polvo al 5% en PBS, se añadieron lisados de *E. coli* que contenían Fab. La unión de Fab se detectó mediante IgG anti-humana de cabra específica para F(ab)2 conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000) utilizando sustrato de fluorescencia Attophos (Roche, nº 11681982001). Se registró la emisión de fluorescencia a 535 nm con excitación a 430 nm.

Se analizaron 9984 clones (384 clones/subcódigo de inmuoadsorción) en el rastreo ELISA primario en TSLP_Avi-APP6 humana biotinilada y TSLP_APP6-Avi cyno biotinilado revestidos en placas NA (véase 3.4.4). Los resultados del ELISA se analizaron con el programa GENios Pro "PrimeScreen". Los resultados se analizaron en comparación con la señal de fondo. Para el antígeno humano, solo se seleccionaron como positivos los pocillos con señales de fondo > 10x y para los pocillos de antígeno cyno con señales de fondo > 5x. Es probable que las señales menores que 5x de fondo sean el resultado de Fab de baja expresión, Fab de baja afinidad, efectos de borde de la placa de microtitulación o valores no reproducibles. La inmuoadsorción en solución dio como resultado 3133, la inmuoadsorción en fase sólida 240 aciertos primarios. 1472 aciertos primarios seleccionados se analizaron adicionalmente en el rastreo ELISA secundario.

Se utilizaron diferentes modos de presentación de antígenos en el rastreo ELISA secundario, incluyendo los antígenos etiquetados con Avi-APP6 C- o N-terminales, antígenos revestidos directamente, antígenos biotinilados presentados en solución, antígenos derivados de HEK, antígenos derivados de *E. coli*, variantes desglicosiladas de los antígenos (tratados con PNGasa). Adicionalmente, se analizó la unión inespecífica al contraobjetivo IL-7 en el rastreo secundario. Para excluir los enlazadores de biotina y etiqueta, se utilizó un antígeno etiquetado con APP-Avi irrelevante biotinilado. Los resultados de ELISA se analizaron con el programa GENios Pro "PrimeScreen" y los resultados se analizaron en comparación con la señal de fondo. Para el antígeno irrelevante y el contraobjetivo IL-7 solo se seleccionaron los resultados con señales < 2 veces el fondo.

Los resultados del rastreo secundario indican que el modo de presentación del antígeno es crucial para la reactividad cruzada. El rastreo del antígeno desglicosilado mostró que podría haber aglutinantes que fijan como objetivo un glico-epítipo. Además, la ubicación de la etiqueta y la composición de la etiqueta pueden influir en la reactividad cruzada debido a cambios conformacionales. Los clones se agruparon de acuerdo con sus perfiles de reactividad cruzada, dando como resultado siete grupos de reactividad cruzada diferentes. El grupo 1-3 comprende todos los clones que presentan reactividad cruzada con huTSLP derivada de *E.coli* solo o en combinación con antígenos derivados de HEK. El grupo 4 incluye todos los clones que son al menos reactivos de forma cruzada con TSLP_Avi-APP6 humana presentada en solución. Por el contrario, el grupo 5 incluye todos los clones que presentan reactividad cruzada con TSLP_Avi-APP6 humana en solución exclusivamente. En el grupo 6 están todos los clones que presentan reactividad cruzada con TSLP_Avi-APP6 humana y con TSLP_Avi-APP6 humana desglicosilada, y en el grupo 7 están todos los clones que presentan reactividad cruzada con todos los antígenos derivados de HEK, incluyendo los antígenos desglicosilados.

Secuenciación y Conversión a IgG

El análisis de secuencia se realizó en 73 clones del grupo de reactividad cruzada 1-3 (clones con reactividad cruzada con TSLP derivado de *E.coli*) y de 569 clones del grupo 4-7 (clones que tienen reactividad cruzada con antígenos derivados de HEK). En total, se identificaron 297 clones únicos de HCDR3, se consolidaron 222 clones y se purificaron 124 clones en formato Fab.

Los clones derivados del tercer y cuarto análisis de secuenciación se colocaron inmediatamente en la conversión de IgG, y posteriormente se clonaron en el vector pMORPH@4_IgG1f para su expresión en células de mamífero.

Determinación de Afinidad

La determinación de la constante de disociación (K_D) de la versión de HuCAL® Fab e IgG de los clones se realizó como sigue: se revistió TSLP humana biotilada a razón de 0,2 µg/ml en tampón de ensayo durante 1 hora a TA en placas MSD de estreptavidina. Las placas de estreptavidina se bloquearon durante la noche a 4°C con PBS con BSA al 3% antes del recubrimiento con antígeno. La valoración en equilibrio de la solución (SET) se realizó con TSLP humana y TSLP cyno bajo las condiciones que se describen a continuación. Se utilizaron fracciones de monómero de proteína de anticuerpo (contenido de monómero de al menos 90%, analizado por SEC analítico; Superdex75 (Amersham Pharmacia) para Fab, o Tosoh G3000SWXL (Tosoh Bioscience) para IgG, respectivamente).

La determinación de la afinidad en solución se realizó básicamente como se describe en la bibliografía (Friquet et al., 1985, J Immunol Meth 77, 305-319). Para mejorar la sensibilidad y precisión del método SET, se transfirió del ELISA clásico a la tecnología basada en ECL (Haenel et al., 2005, Anal Biochem 339, 182-184). 1 mg/ml de anticuerpos específicos para el fragmento (Fab)2 anti-humano de cabra (Dianova) se marcó con MSD de Sulfo-NHS-TAGTM Ester (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los experimentos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de polipropileno y PBS pH 7,4 que contenían BSA al 0,5% y Tween-20 al 0,02% como tampón de ensayo. El antígeno no marcado se diluyó en una serie de 2ⁿ, comenzando con una concentración al menos 10 veces mayor que la K_D esperada. Se utilizaron pocillos sin antígeno para determinar los valores de B_{max}; se utilizaron pocillos que contenían sólo tampón de ensayo para determinar el fondo. Después de la adición de la cantidad apropiada de enlazador (concentración de anticuerpo similar a o por debajo de la K_D esperada, 60 µl de volumen final), la mezcla se incubó durante la noche a TA.

Las placas MSD se recubrieron con antígeno (30 µl por pocillo). Después de lavar la placa con PBS con Tween-20 al 0,02%, las muestras equilibradas se transfirieron a esas placas (30 µl por pocillo) y se incubaron durante 20 min. Después del lavado, se añadieron 30 µl por pocillo del anticuerpo de detección marcado con etiqueta MSD-Sulfo ((Fab)2 anti-humano, dilución final típicamente 1: 2.000) a la placa MSD y se incubó durante 30 min a TA en un agitador Eppendorf. (700 rpm).

Después de lavar la placa MSD y añadir 30 µl/pocillo de tampón de lectura MSD T con tensioactivo, se detectaron señales de electroquimioluminiscencia utilizando un Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE.UU.).

Los datos se evaluaron con el software XLfit (IDBS) aplicando modelos de ajuste personalizados. Para la determinación de la K_D de moléculas Fab se utilizó el siguiente modelo de ajuste (de acuerdo con Haenel et al., 2005), modificado de acuerdo con (Abraham et al., 1996)):

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

[Fab]_t:concentración total de Fab aplicada

x: concentración de antígeno soluble total aplicado (sitios de unión)

B_{max}: señal máxima de Fab sin antígeno

K_D: afinidad

Para la determinación de la K_D de moléculas de IgG se utilizó el siguiente modelo de ajuste para IgG (modificado de acuerdo con Piehler et al., 1997):

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

[IgG]: concentración total de IgG aplicada

x: concentración de antígeno soluble total aplicado (sitios de unión)

B_{max}: señal máxima de IgG sin antígeno

K_D: afinidad

La afinidad también se puede determinar mediante resonancia de plasmón de superficie Biacore (SPR) determinando las constantes de velocidad cinética utilizando el instrumento Biacore 3000 o T200 (Biacore, GE Healthcare). La determinación de la K_D de Biacore mediante antígeno revestido directamente se realizó básicamente como sigue: Se capturaron 50 RU de TSLP humana con antígeno biotinilado en un chip SA (Biacore, GE Healthcare). La celda de flujo de referencia 1 se mantuvo en blanco. PBS pH 7,2 GIBCO + Tween 20 al 0,05% se utilizó como tampón de desarrollo con un caudal de 30 µl/min. Las concentraciones de Fab que varían desde 3,9 a 500 nM se utilizaron con un volumen de inyección de 45 µl y un tiempo de disociación de 300 s. La regeneración del analito unido se realizó con 2x inyecciones de 5 µl de glicina 10 mM pH 1,5. Los datos brutos se ajustaron a un modelo de unión 1: 1, con los parámetros R_{max} establecidos en local y RI establecidos en 0.

Maduración por Afinidad

Se seleccionaron siete candidatos Fab para la maduración por afinidad. Para aumentar la afinidad y la actividad biológica de los Fabs seleccionados, las regiones L-CDR3 y HCDR2 se optimizaron en paralelo mediante mutagénesis en casete utilizando mutagénesis dirigida por trinucleótidos.

(Virnekas et al., 1994, Nucleic Acids Res 22: 5600-5607), mientras que las regiones marco se mantuvieron constantes. Para optimizar la L-CDR3 de los fragmentos Fab parentales, la LCDR3, el marco 4 y la región constante de las cadenas ligeras (405 pb) de la agrupación de enlazador se eliminaron mediante digestión enzimática y se reemplazaron por un repertorio de L-CDR3 diversificadas junto con el marco 4 y el dominio constante. En un segundo conjunto de colecciones, la H-CDR2 se diversificó, mientras que las regiones del marco de conexión se mantuvieron constantes. Las mezclas de ligamiento se sometieron a electroporación en 4 ml de células E. coli TOP10F, produciendo de 108 a 109 colonias independientes. Este tamaño de colección aseguró la cobertura de la diversidad teórica. La amplificación de la colección se realizó tal como se describe (Rauchenberger et al., 2003, J Biol Chem 278: 38194-38205). Para el control de calidad, se seleccionaron y secuenciaron al azar clones individuales. Para la selección de enlazadores mejorados por afinidad, los fagos derivados de colecciones de maduración se sometieron a tres rondas de inmunoabsorción en solución utilizando antígeno humano biotinilado TSLP_Avi-APP6 y cyno TSLP_APP6-Avi. La rigurosidad se incrementó reduciendo la concentración de antígeno en cada ronda de inmunoabsorción (Low et al., 1996, J Mol Biol 260, 359-368. 1996). Además, se realizó la selección de velocidad de reducción de antígeno (Hawkins et al., 1992, J Mol Biol 226, 889-896). Esto se combinó con etapas de lavado prolongadas durante la noche a TA.

Para aumentar adicionalmente la afinidad y la actividad biológica de algunos fragmentos de anticuerpos seleccionados, las regiones L-CDR1, L-CDR3, H-CDR2, H-CDR1 se optimizaron en paralelo mediante mutagénesis en casete utilizando mutagénesis dirigida por trinucleótidos. (Virnekas et al., 1994, Nucleic Acids Res 22: 5600-5607), mientras que las regiones marco se mantuvieron constantes.

No se desean modificaciones postraduccionales (PTMs) en las CDRs, ya que la potencia de anticuerpos de este tipo podría disminuir potencialmente dependiendo de la posición de la PTM, además, las PTMs podrían dar lugar a compuestos no homogéneos. Maduración previa por afinidad, variantes desprovistas de sitios NG, NS y DG se generaron y se incluyeron en una agrupación con el clon parental con el objetivo de seleccionar variantes eliminadas de PTM durante el proceso de selección. Lisados de células bacterianas en bruto que contenían Fab de las variantes generadas se testaron para determinar la unión de antígenos en ELISA sobre TSLP humana. El ADN plasmídico de las variantes se mezcló con el ADN parental para la generación de colecciones de maduración.

Para clasificar los aglutinantes maduros mediante valoración del equilibrio de la solución basada en los principios descritos por Haenel et al., 2005, Anal Biochem 339: 182-184, se equilibró una cantidad constante de extracto de BEL diluido durante la noche con diferentes concentraciones de antígeno. Luego, la mezcla se transfirió a placas MSD que se recubrieron previamente con antígeno y, después de la incubación y el lavado, se añadió un anticuerpo de detección marcado con etiqueta MSD-Sulfo adecuada. Posteriormente, se cuantificó la concentración de Fab no unido mediante detección ECL utilizando el aparato Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, EE.UU.). Los resultados se procesaron utilizando el software XLfit (IDBS), aplicando el modelo de ajuste correspondiente para estimar las afinidades y así identificar los clones más mejorados por la maduración.

Producción

Se transfectaron células eucarióticas HKB11 con ADN del vector de expresión pMORPH®4 que codifica cadenas tanto pesadas como ligeras de Fabs o IgGs anti-TSLP. El sobrenadante del cultivo celular se recogió 3 o 6 días después de la transfección. Después de la filtración en condiciones estériles, la solución se sometió a cromatografía de afinidad de proteína A (MabSelect SURE, GE Healthcare) utilizando una estación de manipulación de líquidos. Si no se indica lo contrario, el intercambio de tampón se realizó para 1x PBS de Dulbecco (pH 7,2, Invitrogen) y las muestras se filtraron en condiciones estériles (tamaño de poro de 0,2 µm). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante espectrofotometría UV y la pureza de las IgGs se analizó en condiciones de desnaturalización y reducción utilizando un sistema Labchip (Perkin Elmer, EE.UU.).

Fab1 anti-TSLP

Fab1 anti-TSLP se derivó de la familia MOR011086, que se identificó en las inmunoadsorciones iniciales. La maduración por afinidad de MOR011086 dio como resultado la generación de MOR014051, que incluía un motivo de modificación postraduccional DG en la HC-CDR2. La eliminación de este motivo DG condujo a la generación de MOR14701 (DG→DA), que luego se germinó en la línea para producir el MOR014824, es decir, Mab1 en la Tabla 2. El Fab1 anti-TSLP en la Tabla 2 es el fragmento Fab de Mab1.

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

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

La potencia de Fab1 anti-TSLP contra una TSLP humana recombinante, una TSLP humana secretada de forma natural y TSLP Cyno se testó en un ensayo de gen informador de luciferasa.

Materiales y Métodos

La TSLP humana secretada de forma natural se obtuvo de células de fibroblastos de pulmón humanas por estimulación con IL-1β, TNF-α e IL-13 durante 24 horas.

Se transfectaron células Ba/F3 con hTSLPR, hIL7Rα y una construcción informadora de Stat5- luciferasa. Stat5 es un efector aguas abajo de la señalización TSLP. Las células se cultivaron en Medios de Crecimiento de Células: RPMI 1640 (Invitrogen, Grand Island, NY) con FCIII al 10% (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), penicilina/estreptomycin al 1% (Invitrogen, Grand Island, NY), 1 µg/ml de puomicina (Sigma, St. Louis, MO) y 5 ng/ml de TSLP humana recombinante (rhTSLP, R&D Systems, Minneapolis, MN). El tampón de ensayo informador se hizo utilizando RPMI 1640 con FCIII al 10%, penicilina/estreptomycin al 1%, y 1 µg/ml de puomicina.

Se cultivaron células Ba/F3 en suspensión en un matraz T162cm² y se dividieron 1:50 dos veces por semana. Se recogieron células Ba/F3 y se sedimentaron en la fase de crecimiento logarítmico medio mediante centrifugación a 200 xg durante 5 minutos y se lavaron en medio de crecimiento celular exento de TSLP. Esto se repitió y luego se incubó durante 18-24 horas en condiciones exentas de TSLP. Al día siguiente, las células se volvieron a sedimentar mediante centrifugación a 200 xg durante 5 minutos y se resuspendieron en el tampón de ensayo informador hasta una concentración celular de 1×10^6 células/mL. 10 µL de células Ba/F3 a razón de 1×10^6 células/mL se combinaron con 70 µL de tampón de ensayo informador en cada uno de los pocillos de una Optiplate de 96 pocillos blanca (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). Esto fue seguido por 10 µL de una dilución en serie 1:10 de 6 puntos de anticuerpo (concentración final superior de 100 nM) y se incubó durante 30 minutos a 37°C/5% de CO₂ en una incubadora humidificada. Finalmente, 10 µL de 0,5 ng/mL de TSLP humana o de cyno o una concentración calculada de TSLP secretada de forma natural con la misma actividad relativa, y la placa se selló para reducir la evaporación y se incubó durante 4 horas a 37°C/5% de CO₂ en una incubadora humidificada. A continuación, se retiró la placa de la incubadora

y se dejó que se equilibrara a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. A esto le siguió la adición de 100 µL de reactivo Steady-Glo (Promega, Madison, WI) a cada uno de los pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se leyeron las placas en el instrumento Envision, utilizando el programa de luminiscencia (exposición de la cámara 1 segundo por pocillo) y los datos se analizaron en Microsoft Excel y Graphpad Prism.

Resultados

Fab1 anti-TSLP demostró una excelente potencia frente a las tres formas de TSLP en el ensayo de gen informador de luciferasa, con una CI50 de 15,4 pM frente a la TSLP humana recombinante (1 ng/ml), CI50 de 17,1 pM frente a la TSLP humana secretada de forma natural y CI50 de 10,8 pM frente a TSLP Cyno. Cuando se calcularon los resultados medios del ensayo del gen informador para múltiples experimentos ($n = 3$), los valores medios de CI50 para Fab1 frente a TSLP humana recombinante fueron $15,3 \text{ pM} \pm 1,5 \text{ pM EMT}$. Los valores medios de CI50 para Fab1 frente a TSLP cyno fueron $9,5 \text{ pM} \pm 0,9 \text{ pM EMT}$.

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

Ejemplo 3: Inhibición de la secreción de TARC (Quimioquina regulada por el timo y la activación) inducida por TSLP de células mononucleares de la sangre periférica humanas primarias (PBMC) por Fab1 anti-TSLP

Para determinar si Fab1 anti-TSLP fue capaz de neutralizar la TSLP en el contexto de una respuesta impulsada por células primarias, se testó la secreción de TARC inducida por TSLP humana o Cyno de PBMCs humanas en presencia o ausencia de Fab1 anti-TSLP.

Materiales y Métodos

Sangre venosa extraída de donantes sanos se heparinizó (Sigma, St. Louis, MO) y se recogió en jeringas de 50 mL y luego se dividió en dos tubos Falcon estériles de 25 ml cada uno. Estos tubos se centrifugaron a 1200 rpm durante 20 minutos con baja aceleración y desaceleración antes de retirar la capa de plasma utilizando una pipeta Pasteur. Se transfirieron 20 ml de sangre de cada uno de los tubos a tubos Falcon nuevos de 50 ml y a cada uno se añadieron 20 mL de PBS (1x, Invitrogen, Grand Island, NY) y 10 mL de dextrano al 4% (p/v, Sigma, St. Louis, MO). Los tubos se invirtieron para mezclar a fondo la sangre y el dextrano y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir que sedimentaran los glóbulos rojos. Se transfirieron 20 mL de sobrenadante a un tubo Falcon de 50 ml nuevo y se lavaron con 30 ml de PBS (1400 rpm durante 8 minutos) antes de aspirar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 10 mL de PBS.

Para lisar los glóbulos rojos, se añadieron a las células 20 mL de agua destilada fría estéril (Sigma, St. Louis, MO) y se mezclaron con una stripette de 20 ml durante 1 minuto antes de añadir 20 ml de 2xPBS frío estéril para detener la lisis. Los tubos se invirtieron varias veces y se centrifugaron a 1400 rpm durante 8 minutos antes de juntarlos en un tubo y lavarlos dos veces con el tampón de ensayo (1400 rpm, 8 minutos). El tampón de ensayo se preparó con RPMI 1640 (con GlutaMax, Invitrogen, Grand Island, NY) con suero AB humano al 10% (Life Technologies, Grand Island, NY) y penicilina/estreptomicina al 1% (Invitrogen, Grand Island, NY).

Las células se contaron y se resuspendieron a una concentración de 10×10^6 células por ml, 100 µl de los cuales se añadieron a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano (1×10^6 células por pocillo). 50 µl/pocillo de anticuerpo anti-TSLP se añadieron a cada uno de los pocillos y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C antes de la adición de TSLP humana o Cyno, produciendo una concentración final de 1 ng/mL de TSLP (66 pM). Las células fueron incubadas durante 24 horas antes de que las placas se centrifugaron a 1300 rpm durante 5 minutos y los sobrenadantes se recogieron para el análisis de quimioquina regulada por el timo y por activación (TARC) por ELISA. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta que se descongelaron para su análisis en el TARC por ELISA (las muestras se testaron en estado puro).

Análisis en el TARC por ELISA se llevaron a cabo siguiendo los protocolos del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Brevemente, el anticuerpo de captura se diluyó hasta la concentración de trabajo en PBS sin proteína de soporte. Placas de microplaca immuno maxiSorp (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) se recubrieron con 100 µL por pocillo del anticuerpo de captura diluido, se sellaron las placas con tapas adhesivas de sellado superior y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, el anticuerpo de captura se aspiró y las placas se lavaron con tampón de lavado, repitiendo el proceso dos veces para un total de tres lavados. Los pocillos se lavaron llenando cada uno de los pocillos con 300 µL de tampón de lavado utilizando un distribuidor de distribución o autolavador. Después del último lavado, el tampón de lavado restante se desechó invirtiendo la placa y secándola con toallas de papel limpias. A continuación, las placas se bloquearon añadiendo 300 µL de diluyente de reactivo (BSA al 1% en PBS) a cada uno de los

pocillos. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante un mínimo de 1 hora. Se repitieron las etapas de lavado y se añadieron por pocillo 100 µL de muestra o patrones en diluyente de reactivo. Las placas se cubrieron con una tira adhesiva y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se repitieron las etapas de aspiración/lavado y a cada uno de los pocillos se añadieron 100 µL del anticuerpo de detección diluido, se cubrieron con una nueva tira adhesiva y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente antes de repetir la etapa de lavado como se describió anteriormente. Se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de la dilución de trabajo de estreptavidina-HRP y las placas se volvieron a tapar y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente, evitando colocar la placa a la luz directa. A continuación, se repitieron las etapas de aspiración/lavado y se añadieron a cada uno de los pocillos 100 µL de solución de sustrato TMB. Las placas se incubaron durante hasta 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, seguido de la adición de 50 µL de solución de parada. La placa se golpeó suavemente para asegurar la mezcla de los pocillos y la densidad óptica de cada uno de los pocillos se determinó inmediatamente utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.

Resultados

Fab1 anti-TSLP fue un inhibidor muy potente de la secreción de TARC inducida por TSLP humana recombinante a partir de PBMC humanas con una CI50 de 20,3 pM y una CI90 de 99,65 pM frente a 1 ng/ml de TSLP humana recombinante. Se demostró que Fab1 anti-TSLP es un potente inhibidor de la secreción de TARC inducida por TSLP Cyno a partir de PBMC humanas con una CI50 de 11,3 pM frente a 1 ng/ml de TSLP Cyno recombinante. Cuando se calcularon los resultados medios de PBMC humanas para múltiples experimentos ($n = 3$), los valores medios de CI50 para Fab1 frente a TSLP humana recombinante fueron $19,7 \text{ pM} \pm 1,9 \text{ pM EMT}$. Los valores medios de CI50 para Fab1 frente a TSLP cyno fueron $11,1 \text{ pM} \pm 0,5 \text{ pM EMT}$.

Ejemplo 4: Inhibición de la secreción de MDC (quimioquina derivada de macrófagos) inducida por TSLP de células mononucleares de la sangre periférica de Cyno primarias (PBMC) por Fab1 anti-TSLP

Materiales y Métodos

Se recogió sangre venosa de cyno en tubos vacutainer que contienen heparina de litio por Covance (Dedham, MA). Se transfirieron 30 ml de sangre de cada uno de los donantes a tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron a 1200 rpm durante 20 minutos con baja aceleración y desaceleración antes de eliminar la capa de plasma con una pipeta Pasteur, dejando un hueco de 0,5 cm entre capas. La capa inferior restante de las células se resuspendió y se transfirieron 10 ml a tubos Falcon nuevos, seguidos de 10 ml de 1xPBS y 5 ml de dextrano al 4% (p/v, Sigma, St. Louis, MO) antes de invertir los tubos 4-5 veces para mezclarlos a fondo. Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente en una campana extractora durante 25 minutos para permitir que los RBCs sedimentaran en el fondo del tubo. Se transfirieron 10 mL de sobrenadante a un tubo Falcon de 50 ml nuevo y se lavaron con 40 ml de medio de cultivo (1400 rpm durante 8 minutos) antes de aspirar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 5 mL de 1xPBS.

Para lisar los glóbulos rojos, se añadieron a las células 20 mL de agua destilada fría estéril (Sigma, St. Louis, MO) y se mezclaron con una stripette de 20 ml durante 1 minuto antes de añadir 20 ml de 2xPBS frío estéril para detener la lisis. Los tubos se invirtieron varias veces y se centrifugaron a 1400 rpm durante 8 minutos antes de agruparlos en un tubo y lavarlos dos veces con el medio de cultivo (1400 rpm, 8 minutos, 4°C). El medio de cultivo se preparó con RPMI 1640 (con GlutaMax, Invitrogen, Grand Island, NY) con clon III fetal al 10% (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y penicilina/estreptomina al 1% (Invitrogen, Grand Island, NY).

Las células se contaron utilizando colorante azul tripano y se resuspendieron a una concentración de 10×10^6 células por ml, 100 µl de los cuales se añadieron a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano (1×10^6 células por pocillo). 50 µl/pocillo de anticuerpo anti-TSLP (100 nM de concentración final máxima) se añadieron a cada uno de los pocillos y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C antes de la adición de TSLP de Cyno, produciendo una concentración final de 0,5 ng/mL de TSLP (33 pM). Las células fueron incubadas durante 24 horas antes de que las placas se centrifugaran a 1400 rpm durante 8 minutos y los sobrenadantes se recogieron para el análisis de quimioquina derivada de macrófagos (MDC, CCL22) por ELISA. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta que se descongelaron para su análisis en ELISA de MDC (diluidos 1:2 en tampón de ensayo antes de la adición a la placa ELISA). Análisis en el MDC por ELISA se llevaron a cabo siguiendo los protocolos del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Resultados

Se demostró que Fab1 anti-TSLP es un potente inhibidor de la secreción de MDC inducida por TSLP de Cyno a partir de PBMC de Cyno con una CI50 de 55,5pM frente a 0,5 ng/ml de TSLP de Cyno recombinante. Cuando se calcularon los resultados medios de PBMC de cyno para múltiples experimentos ($n = 3$), los valores medios de CI50 para Fab1 frente a TSLP de cyno fueron $25,1 \text{ pM} \pm 5,9 \text{ pM EMT}$.

Ejemplo 5: Especies reactividad cruzada de anticuerpos Fab1 anti-TSLP**Materiales y Métodos**

5 Se llevaron a cabo análisis de unión por resonancia de plasmón de superficie (SPR) de Biacore para establecer si el Fab1 anti-TSLP se une a la proteína TSLP humana, de ratón o de rata. Los reactivos Biacore, incluidos el chip sensor CM5 de la serie S, tampón HBS-EP+, kit de captura de Fab humano, EDC (1-etil-3- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida), NHS (N-hidroxisuccinimida), etanolamina, solución de BIAnormalización, glicerol al 70% (p/p) y glicina se adquirieron de GE Healthcare. El tampón de desarrollo utilizado para los análisis tanto de captura de Fab como de unión de TSLP fue 1X

10 HBS-EP+, con HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,05% v/v. TSLP humana, de cyno o de ratón recombinante (PM 15 kDa) se obtuvieron de R&D Systems (Minneapolis, MN). Se obtuvo TSLP de rata recombinante (PM 15,4 kDa) de USCN Life Science Inc. (Wuhan, China).

15 Se utilizó un enfoque de captura para preparar Fab1 anti-TSLP en un chip Biacore CM5 antes de la inyección de TSLP humana, de ratón o de rata. El enlazador de Fab humano se inmovilizó en las cuatro celdas de flujo de un chip CM5 utilizando un kit de captura de Fab humano siguiendo las instrucciones del fabricante. Se especificó un tiempo de contacto de 360 segundos a un caudal de 10 uL/min. La temperatura del compartimiento de la muestra fue de 10°C y la temperatura de análisis fue de 25°C; antes de la inmovilización, el chip CM5 se cebó con HBS-EP+ y se normalizó con solución de BIAnormalización. Se prepararon 375 uL de enlazador de Fab humano 20 ug/mL combinando 15 uL de 0,5 mg/mL de solución madre con 360 uL de tampón de inmovilización pH5 (ambos proporcionados en el kit de captura de Fab humano). Los niveles de inmovilización resultantes fueron aproximadamente 4000-4400 RU de enlazador Fab humano en Fc1, 2, 3 y 4.

25 Se utilizó un método Biacore personalizado para configurar un ensayo cinético, en el que se capturaron aprox. 14 RU de Fab1 anti-TSLP por ciclo. Esto se logró inyectando 5 nM de Fab1 anti-TSLP en tampón HBS-EP+ con un tiempo de contacto de 60 s a un caudal de 10 uL/min, seguido de un período de estabilización de 30 s. La temperatura del compartimiento de la muestra fue de 10°C y la temperatura de análisis fue de 25°C. Utilizando este método Biacore personalizado, se configuró un ensayo cinético para evaluar la interacción de hTSLP, mTSLP y rTSLP con Fab1 anti-TSLP capturado. Para cada uno de los antígenos se prepararon las siguientes 10 concentraciones en HBS-EP+ y se

30 inyectaron sobre la superficie de Fab1 anti-TSLP, incluyendo un blanco de tampón 0 nM, 10 nM, 5 nM, 2,5 nM, 1,25 nM, 0,625 nM, 0,313 nM, 0,156 nM, 0,078 nM, 0,039 nM, 0,02 nM. Después de la captura de ~ 14 RU de Fab1 anti-TSLP, se inyectó antígeno a razón de 45 uL/min durante 360 s, seguido de un período de disociación de 600 s (para todas las concentraciones testadas) o 1200 s (para concentraciones de antígeno 0 nM y 2,5 nM). La regeneración de la superficie del enlazador Fab se logró después de cada uno de los ciclos inyectando glicina-HCl 10 mM, pH 2,0 durante 60 s a 10

35 uL/min, seguido de un lavado extra con tampón HBS-EP+. La temperatura del compartimiento de la muestra fue de 10°C y la temperatura de análisis fue de 25°C.

Todos los experimentos y análisis de SPR se realizaron en instrumentos Biacore T200 controlados por el software Biacore T200 Control. Los datos se procesaron utilizando el software Biacore T200 Evaluation. Se trazaron los sensogramas restados en blanco para el análisis cualitativo de la reactividad cruzada entre especies de Fab1 anti-TSLP.

40

Resultados

45 Los resultados experimentales de reactividad cruzada de Biacore SPR mostraron una unión estrecha de Fab1 anti-TSLP a TSLP humano recombinante, mientras que no hay unión detectable a TSLP recombinante de rata o ratón, lo que es consistente con la baja homología entre TSLP humana y de roedor (aproximadamente 40%).

50 El Fab1 anti-TSLP se unió con una afinidad muy alta a la TSLP recombinante de mono cynomolgus y fue un inhibidor muy potente de la TSLP de cyno recombinante (CI50 = 10,8 pM frente a 1 ng/ml de TSLP recombinante) en el ensayo del gen informador de luciferasa. Tanto en ensayos primarios humanos como de PBMC de cyno, Fab1 anti-TSLP fue un inhibidor muy potente de la secreción de TARC inducida por TSLP de cyno recombinante de PBMC humanas (CI50 = 11,3 pM) y de la secreción de MDC inducida por TSLP de cyno recombinante a partir de PBMC de cyno (CI50 = 55,5 pM).

55 Por lo tanto, Fab1 anti-TSLP mostró reactividad cruzada entre especies restringida, reconociendo TSLP de cynomolgus recombinante, pero no TSLP de rata o ratón.

Ejemplo 6: Eficacia del anticuerpo anti-TSLP de ratón en modelos de asma de enfermedad murina**Materiales y Métodos**

60 El efecto de la neutralización de TSLP sobre las respuestas alérgicas de las vías respiratorias se evaluó en un modelo murino de sensibilización a la ovoalbúmina sistémica (OVA), seguido de exposición local al antígeno en el pulmón. Este modelo se caracterizó por el desarrollo de un fenotipo Th2 e inflamación eosinofílica asociada. Dado que el Fab1 anti-TSLP del Ejemplo 1 no reaccionó de forma cruzada con las proteínas TSLP de roedor como se describe en el Ejemplo 5,

se evaluó el efecto de la neutralización de TSLP utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TSLP de ratón sustituto disponible comercialmente (MAB555, R&D Systems, Minneapolis, MN), del que se informó que neutraliza completamente la actividad biológica de TSLP murino recombinante con una CI50 de aproximadamente 1,3 nM frente a TSLP murino 0,5 nM (datos proporcionados por R&D Systems). También se compraron kits de ELISA específicos para todas las citoquinas y quimioquinas de R&D Systems.

Se inmunizaron ratones Balb/c hembras con OVA (o solución salina) y alumbre como adyuvante el día 1 y el día 14. En resumen, los ratones se inmunizaron intraperitonealmente con 0,2 mL de NaCl (solución salina) al 0,9% p/v que contenía 100 µg de ovoalbúmina (5 veces cristalizado, Sigma, Reino Unido) adsorbida en 1,6 mg de hidróxido de aluminio (Sigma). El día 21, los ratones se expusieron a OVA o solución salina administrada en forma de aerosol y se sacrificaron 24 h más tarde. La inflamación se evaluó mediante recuentos celulares diferenciales y totales dentro del lavado broncoalveolar (BAL), mientras que las citoquinas y quimioquinas se midieron mediante ELISA específico.

Veinticuatro horas después de la última exposición intranasal con OVA o PBS, los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de 4 mg/kg de pentobarbital sódico (Rhone Merieux, Harlow, Reino Unido). Se recogió líquido BAL canulando la tráquea y lavando los pulmones con un total de 1,2 ml de solución salina (3 x 0,4 mL cada uno). Para cada una de las muestras se determinó un recuento total de células y se realizó la preparación de citospina (Shandon Scientific Ltd., Cheshire, Reino Unido). Las células se tiñeron con Diff-Quik (Baxter Dade AG, Dudingen, Suiza) y se realizó un recuento diferencial de 200 células utilizando criterios morfológicos estándar.

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

Los resultados se expresan como media $\pm$ EMT del número indicado de experimentos. Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar la significancia entre los grupos. Si se encontró una varianza significativa, se utilizó un test T de Student para datos no apareados para evaluar la comparación entre medias. Se consideró significativo un valor de $p \leq 0,05$.

Resultados

La sensibilización y la exposición a OVA dieron como resultado un número incrementado de células dentro del fluido de lavado broncoalveolar, que incluía eosinófilos y neutrófilos, en comparación con los animales de control (Fig. 3). Esto es consistente con la experiencia previa de respuestas después de un desafío con un solo antígeno. Además, un cierto número de mediadores inflamatorios también se regularon positivamente dentro del fluido de lavado de ratones sensibilizados/estimulados con OVA en comparación con los controles (Figs. 4A-4C).

El tratamiento con anticuerpos anti-TSLP murino (10 mg/kg) inhibió significativamente el número total de células dentro del fluido BAL en aproximadamente un 50%, mientras que los recuentos de eosinófilos se redujeron en un 80%. El tratamiento con anticuerpos en ausencia de sensibilización al antígeno no alteró significativamente la composición celular inicial del lavado. El análisis de los marcadores aguas abajo de la actividad de TSLP reveló niveles reducidos de IL-13 (figura 4A), una citoquina asociada con la inflamación alérgica de las vías respiratorias, y quimioquinas eotaxina-2 y TARC (Figs. 4B y 4C), ambas conocidas como quimioatrayentes de células Th2 y eosinófilos que fueron generados por células dendríticas estimuladas por TSLP.

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

Materiales y Métodos

La farmacocinética (PK) y la disposición pulmonar de Fab1 anti-TSLP se estudiaron en ratas después de una inyección en bolo intravenoso (IV), una instilación intratraqueal (ITI) o una inhalación de 20 min únicamente por la nariz de una dosis nominal única de Fab1 anti-TSLP nebulizado a razón de 1 mg/kg. Se determinaron las concentraciones de Fab1 anti-TSLP en diversos momentos posteriores a la dosis en plasma, fluido BAL, así como en muestras de homogeneizado de pulmón (después de BAL y perfusión sanguínea de la vasculatura pulmonar).

Resultados

Fab1 anti-TSLP se eliminó de la circulación sistémica rápidamente después de la inyección IV, con una semivida de eliminación terminal promedio de aproximadamente 3 horas. Después de la ITI o la inhalación, el Fab1 anti-TSLP se absorbió lentamente en la circulación sistémica, alcanzando la Cmax plasmática alrededor de las 2 h para ambas vías, y las semividas terminales promedio fueron más largas que las determinadas después de la administración IV (7 h después de la ITI y 4 h después de la inhalación, en comparación con 3 h después de la IV), lo que indica una cinética de velocidad

de absorción limitada. La biodisponibilidad sistémica de Fab1 anti-TSLP promedió aproximadamente el 6% después de ITI y el 1% después de la inhalación, posiblemente debido a una mayor fracción de deposición pulmonar después de ITI en comparación con la inhalación. En comparación con la exposición sistémica baja, las concentraciones de Fab1 anti-TSLP en el fluido BAL y el homogeneizado pulmonar fueron mucho más altas (> 100 veces más altas) después de ITI o inhalación, lo que representa el 97-99% de la cantidad total de dosis recuperada de las tres matrices. (66-79% para BAL y 20-31% para pulmón) a las 2, 6, 24 o 72 horas después de la dosis. Las semividas de disposición estimadas de Fab1 anti-TSLP promediaron aproximadamente 7 y 9 horas en BAL y homogeneizados de pulmón, respectivamente.

Ejemplo 8: Caracterización farmacocinética de Fab1 anti-TSLP en monos

Materiales y Métodos

La toxicocinética, PK/PD y la distribución pulmonar de Fab1 anti-TSLP se estudiaron en monos cynomolgus después de una inhalación diaria de 1 h durante 14 días a una dosis de 1, 10 y 20 mg/kg (Grupos 3-5), o una administración de una dosis única de retrocruzamiento de 1 mg/kg IV, seguida de una dosis única inhalada de 20 mg/kg después de un período de lavado de 16 días (Grupo 6). Se recogieron muestras de sangre seriadas para PK/PD, se evaluó la TSLP total como un marcador de PD y evaluaciones de inmunogenicidad. Además, también se recogieron muestras de homogeneizado de pulmón (en la terminal) y muestras de fluido BAL (terminal para los Grupos 3-5 y antes de la dosis intravenosa y terminal para el Grupo PK 6) para las evaluaciones de PK, TSLP total e inmunogenicidad (solo para el fluido BAL).

Resultados

La exposición sistémica de Fab1 anti-TSLP en suero fue baja después de la inhalación con una biodisponibilidad estimada de menos del 1% al nivel de dosis inhalada de 20 mg/kg. La dosis inhalada de 1 mg/kg no produjo exposición sistémica detectable alguna y las dosis inhaladas de 10 y 20 mg/kg mostraron una exposición sistémica equiparable a Fab1 anti-TSLP. La C_{max} se alcanzó aproximadamente 3 horas después de la inhalación. De manera similar a la PK de rata, las semividas de eliminación sistémica fueron más largas después de la inhalación (aproximadamente 7 horas) en comparación con la IV (aproximadamente 2,3 horas), lo que indica una cinética de velocidad de absorción limitada. Se observó una acumulación de exposición en suero después de 14 días de dosificación. En comparación con la baja exposición al suero (Fig. 5), los datos preliminares sobre las concentraciones de Fab1 anti-TSLP en el fluido BAL terminal y los homogeneizados de pulmón fueron mucho mayores y aumentaron con dosis crecientes (Fig. 6).

Ejemplo 9: Cristalografía y mapeo del Epítipo de Fab1 anti-TSLP

En este Ejemplo, se cristalizó Fab1 anti-TSLP en estado libre o en complejo con TSLP humana, y se determinaron las estructuras cristalinas correspondientes. El análisis de la unión de Fab1 anti-TSLP a TSLP humana basado en los datos de rayos X proporcionó información sobre el epítipo de Fab1 anti-TSLP en TSLP humana.

Materiales y Métodos

Preparación y purificación de TSLP humana y Fab1 anti-TSLP

Fab1 anti-TSLP se generaron por digestión de mAb1 anti-TSLP (10,6 mg) con 21 µg de papaína durante 2 horas a temperatura ambiente (TA), en Tris 100 mM (pH 7,0) con DTT 10 mM. La reacción se detuvo con 30 µM del inhibidor de papaína E64. Fab1 anti-TSLP fue luego purificado sobre una columna Lambda de 5 mL, equilibrada con fosfato sódico 20 mM (pH 7,0). El Fab se eluyó con ácido cítrico 0,1 M pH 3,0, y el pH de las fracciones recogidas se ajustó inmediatamente con Tris 1M pH 8,5 diluido 1:10. El análisis LC-MS mostró una masa observada de 47107,7 Da que coincidía con la secuencia de aminoácidos esperada con la cadena pesada escindida después de Thr228 y que llevaba un residuo de ácido piroglutámico en su extremo amino. Para la cristalización, el tampón se cambió a Tris-HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM mediante etapas repetidas de concentración-dilución utilizando un dispositivo de ultrafiltración y la muestra se concentró finalmente a 13 mg/ml de Fab1 anti-TSLP.

Se clonó una construcción de TSLP humana (entrada Uniprot Q969D9; aminoácidos 29 a 159) con una etiqueta de hexahistidina N-terminal seguida de un sitio de escisión PreScission (proteasa HRV-3C) y se expresó en *E. coli* como cuerpos de inclusión. Para el replegamiento, 89,4g de células de *E. coli* se lisaron en 715 ml de Tris 50 mM (pH 7,0) con EDTA 1 mM MgCl₂ 6 mM y sacarosa 0,375 M con un homogeneizador de alta presión Avestin®. Después de 30 min de incubación con 3,7 kU de benzonasa, el lisado se centrifugó durante 30 minutos a 13.000 rpm con un rotor de ángulo fijo SS-34. El sedimento se resuspende en 387ml de Tris 100 mM (pH 7,0) con EDTA 20 mM, NaCl 0,5 M, Triton X-100 al 2% y luego se centrifugó a 13.500 rpm durante 50 minutos. El sedimento se resuspendió de nuevo en 387ml de Tris 100 mM pH 7,0 con EDTA 20 mM, se centrifugó a 13.500 rpm durante 30 minutos, y este proceso de lavado se repitió cuatro veces, dando lugar a 13 g de cuerpos de inclusión. A continuación, los cuerpos de inclusión se solubilizaron en 65 ml de una solución de hidrocloreuro de guanidina 6 M con acetato de potasio 50 mM (pH 5,0), EDTA 5 mM y TCEP 10 mM. Al cabo de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó durante 30 minutos a 20.000 rpm (rotor de ángulo fijo SS-34). El sobrenadante (70 ml) se diluyó hasta 100 ml con la solución de hidrocloreuro de guanidinio arriba

descrita. El replegamiento se realizó mediante dilución rápida a 4°C con 10 L de Tris 100 mM (pH 8,25) con hidrocloreuro de arginina 0,5 M, EDTA 5 mM y GSH 1 mM. Después de la dilución, se añadió disulfuro de glutatión (GSSG) 0,1 mM y la mezcla de replegamiento se incubó con agitación lenta durante 7 días a 4°C. A continuación, se ajustó el pH a 5,1 con ácido acético y se añadió GSSG 0,1 mM para destruir el TCEP restante. La solución de replegamiento ligeramente turbia se filtró mediante una cápsula filtrante Sartobran de 0,65/0,45 µm y se concentró hasta 750 ml con una membrana de flujo cruzado Pellicon de 10 kD. La solución concentrada se dializó frente a 10 L de acetato de sodio 50 mM pH 5,4. Se recuperaron aproximadamente 550 mg de TSLP replegada. El análisis LC-MS de la muestra purificada final confirmó que se formaron todos los puentes disulfuro y mostró 94% de producto des-Met (PM = 16862,8 Da) y un 6% de proteína con metionina N-terminal. Para la cristalización con Fab1 anti-TSLP se utilizó la muestra de TSLP replegada sin escindir la etiqueta N-terminal con la proteasa PreScission.

Para preparar el complejo TSLP-Fab, se añadió un exceso molar doble de la proteína His₆-PreSc-TSLP en Tris 25 mM (pH 7,4) con NaCl 50 mM a Fab1 anti-TSLP, la muestra se concentró por ultrafiltración a aproximadamente 10 mg/ml, se cargó en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño SPX-75 y se eluyó isocráticamente en Tris-HCl 10 mM pH 7,4 con NaCl 25 mM. La fracción máxima se concentró a 9,2 mg/ml mediante ultrafiltración y se sometió a rastreo de cristalización.

Cristalización y recopilación de datos de rayos X

Los cristales se cultivaron en placas de 96 pocillos (placas Innovadyne SD2) mediante difusión de vapor en forma de gota. En detalle, 0,2 µl de solución madre de proteína se mezclaron con 0,2 µl de solución de reserva, y la caída se equilibró frente a 80 µl de la misma solución de reserva a 20°C. Los experimentos se configuraron con un sistema robótico Phoenix (Art Robbins Instruments), se almacenaron en un hotel RockImager (Formulatrix) y se tomaron imágenes automáticamente.

Para la recopilación de datos de rayos X, un cristal se montó directamente en un cryo-loop y se enfrió instantáneamente en nitrógeno líquido. Los conjuntos de datos de rayos X se recopilaron en Swiss Light Source, línea de haz X10SA, con un detector de píxeles Pilatus, utilizando radiación de rayos X de 1,00001 Å. En ambos casos, se registraron 720 imágenes de 0,25° de oscilación cada una a una distancia de cristal a detector de 345 mm y se procesaron con la versión XDS del 6 de diciembre de 2010 (Kabsch 1993, J Appl Crystallogr; 26: 795-800), como implementado en APRV.

Determinación y análisis de estructuras

La estructura de Fab1 anti-TSLP se determinó por reemplazo molecular con el programa Phaser (McCoy et al., 2007, J Appl Crystallogr 40:658-674), utilizando la estructura cristalina de un fragmento Fab de anticuerpo anti-CD132 como el modelo de partida. El Fab de anticuerpo anti-CD132 se seleccionó sobre la base de la similitud de secuencia con el Fab1 anti-TSLP. Los dominios variable y primero constante se utilizaron como modelos de búsqueda independientes para permitir la variabilidad del ángulo del codo de Fab. La estructura se refinó utilizando ciclos iterativos de construcción de modelos seguidos de refinamiento cristalográfico automatizado con los programas Coot 0.8.0 (Kit de herramientas orientado a objetos cristalográficos; Emsley et al., 2010, Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr; 66:486-501) y Autobuster 2.11.5 (Bricogne et al., 2011, BUSTER versión 2.11.2. Cambridge, Reino Unido: Global Phasing Ltd.).

La estructura del complejo TSLP-Fab se determinó mediante sustitución molecular con el programa Phaser, utilizando las estructuras refinadas del Fab1 anti-TSLP libre y de TSLP humanos previamente determinadas internamente en complejo con el fragmento Fab de otro anticuerpo. De nuevo, los dominios variable y primero constante del Fab1 anti-TSLP se utilizaron como modelos de búsqueda independientes. La estructura se refinó como se describió anteriormente para el Fab libre, con Coot 0.8.0 y Autobuster 2.11.5.

La inspección visual de las estructuras cristalinas se llevó a cabo utilizando los programas Coot (Emsley et al., 2010, Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr; 66:486-501) y PyMOL (Molecular Graphics System; DeLano Scientific: Palo Alto, CA). La calidad de los modelos refinados finales se evaluó con los programas Coot y PROCHECK v3.3 (Laskowski et al., 1992, J Appl Crystallogr; 26: 283-291). Residuos de TSLP humana que se vuelven menos accesibles al disolvente tras la unión del Fab1 anti-TSLP fueron identificados por el programa AREAIMOL del conjunto de programas CCP4 (Collaborative Computational Project, Número 4, 1994). Los contactos intermoleculares se definieron utilizando una distancia de corte de 4,0 Å y se identificaron con el programa CCP4 NCONT.

Resultados

Estructura cristalina del Fab1 anti-TSLP

El Fab1 anti-TSLP libre y su complejo con TSLP humana se cristalizaron en placas de 96 pocillos mediante el método de difusión de vapor en gotas asentadas, a 19°C. Curiosamente, las dos muestras de proteína cristalizaron en las mismas condiciones de cristalización: (NH₄)₂SO₄, 0,17 M, acetato de sodio 85 mM pH 5,6, PEG MME 2000 al 25,5%, glicerol al 15%. Los cristales aparecieron después de 4-5 semanas y alcanzaron su tamaño completo en unos pocos días.

El cristal de Fab libre estaba en el grupo espacial ortorrómbico $P2_12_12_1$, con una molécula de Fab por unidad asimétrica. El cristal del complejo Fab-TSLP estaba en el grupo espacial $I222$, con un completo por unidad asimétrica (Tabla 3). Ambos cristales se difractaron a alta resolución, y de cada uno de ellos se pudo recoger un conjunto completo de datos de difracción de buena calidad y de alta redundancia (Tabla 3).

La determinación de la estructura por reemplazo molecular se realizó utilizando una estructura de TSLP humana previamente determinada. El refinamiento con autobuster condujo a buenas estadísticas de refinamiento y geometría global (Tabla 3). Dos residuos de anticuerpos, Asp50L y Asp152L, eran valores atípicos de Ramachandran en la estructura del Fab libre. Además de estos dos residuos, un tercer residuo de anticuerpo, Tyr103H, también era un valor atípico de Ramachandran en la estructura del complejo Fab-TSLP. Estos tres residuos tenían una densidad de electrones bien definida y, por lo tanto, son valores atípicos de geometría genuina. Digno de mención, Asp50L y Tyr103H son residuos de CDR implicados en la unión de TSLP como se describe más adelante.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera de Fab1 anti-TSLP se proporcionan en las FIGs. 1A y 1B, con las CDR subrayadas (según la definición de Kabat, 1991, Sequences of proteins of immunological interest, Publicación NIH N° 91-3242) y los residuos ubicados en la interfaz anticuerpo-antígeno marcados con *.

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

	Fab1 anti-TSLP libre	Complejo Fab 1 con TSLP humana
Recopilación de datos		
Grupo espacial	$P2_12_12_1$	$I222$
a, b, c (Å)	69,05, 72,33, 113,58	77,68, 78,46, 233,23
α, β, γ (°)	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00
Resolución (Å)	1,85 (1,90-1,85)*	2,00 (2,05-2,00)*
R_{sim} o $R_{\text{fusión}}$	0,044 (1,108)	0,071 (1,83)
$I/\sigma(I)$	21,4 (1,42)	16,6 (1,14)
Completitud (%)	99,9 (99,8)	99,9 (99,9)
Redundancia	6,6 (6,2)	6,6 (6,4)
Refinamiento		
Resolución (Å)	37,00-1,85	40,00-2,00
Nº de reflexiones	49,249	48,502
$R_{\text{trabajo}} / R_{\text{libre}}$	0,201 / 0,222	0,194 / 0,214
Nº de átomos		
Proteína	3,245	4,042
Iones sulfato	0	3x5
Aguas	213	195
Factores B (Å ²)		
Cadena ligera de Fab (cadena L)	45,7	52,4
Cadena pesada de Fab (cadena H)	48,3	48,5
TSLP (cadena T)	-	98,5
Aguas (cadena W)	51,4	53,1
Desviaciones r.m.s.		
Longitudes de enlace (Å) / ángulos (°)	0,009 / 1,05	0,010 / 1,07
Nota: (*) Los números entre paréntesis corresponden a la envoltura de alta resolución.		

Estructura cristalina del Fab1 anti-TSLP en complejo con TSLP humana

La secuencia de aminoácidos de la TSLP humana recombinante utilizada en este ejemplo (SEQ ID NO: 38) se proporciona en la FIG. 2. TSLP humana madura comienza en Tyr29. La construcción utilizada aquí tenía una etiqueta de hexahistidina N-terminal (residuos 15-20) seguida de un sitio de reconocimiento de proteasa HRV-3C (PreScission) (residuos 21-28) y residuos 11-14 resultantes de la clonación. Asn64 y Asn119 eran sitios potenciales de glicosilación enlazados a N; y los residuos 127-130 constituían el sitio potencial de escisión de furina (RRKR, SEQ ID NO: 39). Los elementos de estructura secundaria se muestran debajo de la secuencia de aminoácidos: los recuadros representan hélices α A, B, C y D, y las líneas gruesas representan las regiones de bucle.

TSLP no muestra similitud significativa alguna en la secuencia de aminoácidos con otros miembros de la superfamilia de citoquinas IL-2. Sin embargo, TSLP se plegó como un haz de cuatro hélices con topología arriba-arriba-abajo-abajo, tal como IL-2, IL-7 y muchas otras citoquinas (FIG. 7). La hélice α_A poseía una fuerte torcedura cerca de su centro, alrededor

de la posición de Thr46. Las hélices α_B y α_C eran bastante cortas con solo tres vueltas cada una; y la hélice C-terminal α_D era más larga con casi cinco vueltas (FIG. 7). Tres disulfuros (Cys34-Cys110, Cys69-Cys75, Cys90-Cys137) estabilizaron este haz de cuatro hélices de la cadena corta. Sin embargo, las dos conexiones de retrocruzamiento entre α_A y α_B , y α_C y α_D estaban ampliamente desordenadas y no se veían en esta estructura cristalina. Tres aminoácidos del bucle α_B - α_C y los últimos cinco residuos carboxilo terminales también faltaban en la estructura refinada final. El sitio de escisión de furina potencial y los sitios de N-glicosilación se ubicaron dentro de las conexiones que faltaban.

Una visión de conjunto de la estructura tridimensional del complejo Fab-TSLP se muestra en la FIG. 7.

Fab1 anti-TSLP unido principalmente a la hélice α_A de TSLP, que atraviesa la ranura poco profunda revestida por H-CDR1 y H-CDR2 en un lado, y por H-CDR3 y L-CDR3 en el otro lado. La torcedura pronunciada de hélice α_A ocupaba la parte central de la ranura. Las hélices flanqueantes α_C y α_D y los primeros cuatro residuos del bucle α_A - α_B contribuían a contactos adicionales al anticuerpo.

La formación del complejo Fab-TSLP enterró aproximadamente $1700\text{\AA}^2$ de superficie accesible al disolvente combinado, con 25 residuos de aminoácidos Fab y 25 residuos de aminoácidos TSLP que experimentan una reducción en su superficie accesible al disolvente tras la formación del complejo. Entre ellos, 20 residuos Fab y 16 residuos TSLP (véase la Tabla 4) estaban implicados en contactos intermoleculares directos, cuando se utilizó una distancia de corte de 4,0 Å. La estadística S_c de complementariedad de forma (Lawrence y Colman, 1993, J Mol Biol; 234:946-50) fue igual a 0,72, un valor relativamente alto para un complejo de anticuerpo-proteína (Sundberg y Mariuzza, 2003, Adv Protein Chem; 61:119-60). Las seis CDRs de Fab1 anti-TSLP contribuían a la unión a TSLP. Además, seis aguas bien definidas ubicadas en la interfaz anticuerpo-antígeno median las interacciones de unión.

TABLA 4. Residuos de epítomos y parátomos

Epítomo de TSLP		Parátomo de Fab1 anti-TSLP	
Elemento estructural	Residuos de contacto	Residuos de contacto	Elemento estructural
α_A	Lys38	Thr28H	H-CDR1
	Ala41	Tyr32H	H-CDR1
	Leu44	Tyr103H, Ile102H, Tyr48L	H-CDR3, L-CDR2
	Ser45	Asp31H, Tyr32H	H-CDR1
	Thr46	Asp56H	H-CDR2
	Ser48	Tyr103H	H-CDR3
	Lys49	Trp33H, Glu101H, Tyr103H, Tyr104H, Tyr105H	H-CDR1, H-CDR3
	Ile52	Tyr103H, Tyr104H, Tyr31L, Trp92L	H-CDR3, L-CDR1, L-CDR3
	Thr53	Trp92L	L-CDR3
bucle α_A - α_B	Ser56	Trp92L	L-CDR3
	Gly57	Trp92L	L-CDR3
	Thr58	Trp92L	L-CDR3
	Lys59	Gly28L, Ser29L, Lys30L, Tyr31L, Asp50L, Asn65L	L-CDR1, L-CDR2, L-FR3
α_C	Lys101	Asp56H	H-CDR2
α_D	Gln145	Tyr103H, Tyr31L	H-CDR3, L-CDR1
	Arg149	Asn51L, Glu52L	L-CDR2
Las listas de residuos de epítomo y parátomo en contacto directo se derivaron de las coordenadas refinadas finales con el programa CCP4 NCONT, utilizando un corte de distancia de 4,0 Å.			

Los residuos de TSLP ubicados en la interfaz de unión se identificaron a partir de las coordenadas cristalográficas calculando (i) los contactos intermoleculares entre átomos que no son de hidrógeno menores que 4,0 Å, y (ii) la reducción en la superficie accesible al disolvente tras la formación del complejo. Los resultados se muestran gráficamente en la FIG. 8, y una vista de anticuerpos del epítomo TSLP se proporciona en la FIG. 9. Como puede verse a partir de estas dos figuras, la hélice α_A , junto con los primeros cuatro residuos del bucle α_A - α_B formaban el núcleo del epítomo, y contribuían al 82% del número total de contactos intermoleculares y de la superficie enterrada accesible al disolvente en TSLP. Además, la gran mayoría de los residuos de epítomos clave se encontraban en esta región: Lys49, Ile52, Gly57 y

Lys59. En comparación, las hélices α_C y α_D contribuían a muy pocos residuos de epítipo: Lys101 (α_C), Gln145 y Arg149 (α_D).

Todas las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de Fab1 anti-TSLP contribuían a la interfaz de unión, como se evidencia por una reducción en su superficie accesible al disolvente en la unión al antígeno y sus contribuciones a contactos intermoleculares directos (FIGs. 10A y 10B). Además, Asn65L de la tercera región de marco de la cadena ligera (L-FR3) fue también localizado en la interfaz de unión al antígeno, pero solo hizo una débil (3,6 Å) interacción unida a H a Lys59 de TSLP.

El bucle H-CDR3 jugó un papel particularmente importante. Glu101H hizo la interacción crítica sal-puente con Lys49 de TSLP, y las tres tirosinas consecutivas situadas en la punta del bucle, Tyr103H, Tyr104H y Tyr105H, contribuían colectivamente en el 58% de los contactos realizados por toda la cadena pesada. Trp33H de H-CDR1 y Asp56H de H-CDR2 eran también importantes residuos parátomos, que contribuían en la unión de Lys49 y Lys101 de TSLP, respectivamente.

Trp92L era el único residuo L-CDR3 que hizo contactos directos con el antígeno. Este residuo está situado en la punta de L-CDR3 y no adoptó una conformación definida en la estructura cristalina del Fab1 anti-TSLP libre. En el complejo TSLP, sin embargo, la cadena lateral tenía una densidad de electrones bien definida, e hizo amplios contactos con el bucle α_A - α_B , ascendiendo su contribución al 42% de los contactos realizados por toda la cadena ligera. Asp50L de L-CDR2 y Tyr31L de L-CDR1 fueron otros dos importantes residuos de parátomo proporcionados por la cadena ligera. El primero hizo una interacción electrostática muy corta (2,8 Å) con Lys59 de TSLP. El último contribuyó en las interacciones de unión con Ile52, Lys59, y Gln 145 de TSLP, y también estabilizó la conformación unida del bucle H-CDR3 a través de interacciones π - π con Tyr103H y Tyr104H.

Modo de acción de Fab1 anti-TSLP

La señalización de TSLP requiere el ensamblaje de un complejo ternario que comprende TSLP, la cadena TSLPR afín y la cadena IL-7R α compartida. La formación del complejo binario TSLP-TSLPR es un requisito previo para el reclutamiento de la cadena IL-7R α . El complejo TSLP-Fab1 humano se superpuso en el complejo ternario TSLP-TSLPR-IL-7R α de ratón, basado en todos los átomos C α de TSLP. La superposición estructural demostró que el Fab1 anti-TSLP bloqueó la unión de TSLP tanto a TSLPR como a IL-7R α . La hélice α_A de TSLP era el elemento central del epítipo Fab1 anti-TSLP (FIG. 11 B), y esta hélice también jugó un papel central en la unión tanto a TSLPR como a IL-7R α (FIG. 11A). Además, la hélice α_C participó en la unión a IL-7R α y la hélice α_D era parte de la interfaz de unión a TSLPR. Dado que estos dos hélices también contribuyeron al epítipo de Fab1 anti-TSLP, la interferencia estérica entre Fab1 anti-TSLP y las dos cadenas del receptor era extensa. La cadena ligera del anticuerpo se solapó ampliamente con el dominio D2 de la TSLPR, mientras que la cadena pesada se solapó con el dominio IL-7R α D2 y también con algunos de los bucles de unión a citoquina del dominio D1 (FIG. 11C). Los datos demostraron que Fab1 anti-TSLP neutralizaba TSLP por barrido de la citoquina y la prevención de su unión al receptor TSLPR, bloqueando así la formación del complejo de señalización de alta afinidad con IL-7R α .

En resumen, se determinaron las estructuras cristalinas de alta resolución del Fab1 anti-TSLP en estado libre o en complejo con TSLP humana recombinante replegada. Se encontró que Fab1 anti-TSLP se une principalmente a la hélice α_A (residuos de aminoácidos Lys 38 a Thr 53) de TSLP humana, con pocas pero importantes contribuciones de las hélices α_C (Lys101) y α_D (Gln145, Arg149) y del bucle α_A - α_B (residuos de aminoácidos Ser 56 a Lys 59). Una superposición estructural de TSLP humana en complejo con Fab1 anti-TSLP sobre el complejo TSLP de ratón publicado con los dominios extracelulares de IL-7RA y TSLPR demostró que Fab1 anti-TSLP compite tanto con IL-7RA como con TSLPR por la unión a TSLP. TSLP unida a Fab1 anti-TSLP no puede unirse a TSLPR y el reclutamiento del receptor de IL7R α también se inhibe debido al impedimento estérico extenso entre el Fab y el receptor de IL-7 α .

Ejemplo 10: Procedimiento de secado por pulverización y formulación de Fab1 anti-TSLP

Equipos y Operaciones de Secado por Pulverización

Se utilizó un secador por pulverización hecho a medida para secar por pulverización un material de alimentación. La configuración del secador por pulverización comprende un atomizador de fluido doble de una sola boquilla, una cámara de secado, un ciclón, un adaptador, una válvula de aislamiento y un colector de 1 litro en una camisa de temperatura controlada. En las realizaciones descritas en esta memoria, el procedimiento de secado por pulverización puede incluir un procedimiento de atomización, un procedimiento de secado y un procedimiento de recogida de partículas.

Un procedimiento de atomización ejemplar puede incluir las siguientes etapas: (A1) un fluido de material de alimentación formulado puede alimentarse a través de una bomba peristáltica (Watson Marlow) a un caudal controlado a un atomizador asistido por aire de una sola boquilla montado en el secador por pulverización; (A2) se alimenta aire seco comprimido con un caudal controlado a una boquilla de gas convergente concéntrica; y (A3) la expansión del aire en la punta de la boquilla atomiza la corriente de material de alimentación en una pulverización de gotitas finas.

El procedimiento de secado puede incluir las siguientes etapas: (B1) aire de secado calentado con un calentador eléctrico se alimenta a la cámara de secado a una temperatura establecida y un caudal controlado; (B2) el aire de secado caliente interactúa con la pulverización de gotitas finas de la Etapa A3. El disolvente (agua) en las gotitas se evapora, dando como resultado partículas sólidas; y (B3) partículas y vapor de disolvente/aire salen de la cámara de secado a una temperatura predeterminada.

El procedimiento de recogida de partículas puede incluir las siguientes etapas: (C1) las partículas y el vapor/aire no disolvente de la Etapa B3 entran en el ciclón a alta velocidad tangencial; (C2) las partículas se separan de la mezcla de aire mediante fuerza centrífuga y se recogen en el fondo del ciclón en un recipiente de recogida de temperatura controlada; y (C3) el aire/vapor no disolvente de escape pasa a través de un filtro y se ventila a la atmósfera dentro del aislador.

Procedimiento y formulación de polvos respirables de Fab1 anti-TSLP

Esta parte proporciona una formulación y un procedimiento de secado por pulverización que se utilizan para preparar polvos respirables que comprenden partículas de Fab1 anti-TSLP formuladas con diversos excipientes. Esto implicó secar por pulverización un material de alimentación acuoso monofásico que comprende la proteína (Fab1 anti-TSLP) y excipientes que funcionan principalmente como agentes potenciadores de la dispersabilidad (p. ej., trileucina) o agentes formadores de vidrio (p. ej., sacáridos, sales tampón). El pH del material de alimentación se controló con un tampón de histidina-HCl a un pH objetivo de pH 5,0 - pH 5,5. Mediante la aplicación de principios de modificación por ingeniería de partículas, se seleccionaron los excipientes y la composición para crear un polvo que comprendía partículas rugosas - cada una con un núcleo de proteína estabilizado dentro de una matriz vítrea rodeada por una capa de excipiente hidrofóbico que mejoraba la dispersabilidad del polvo y protegía el agente activo.

TABLA 5. Formulaciones de Fab1 anti-TSLP

Lote nº	Fab1 anti-TSLP	Histidina	Trehalosa	Manitol	Trileucina
	% p/v	% p/v	% p/v	% p/v	% p/v
569-38-01	80	20	0	0	0
569-38-02	90	10	0	0	0
569-38-03	60	10	30	0	0
569-38-04	60	5	20	5	10
569-38-05	40	5	35	0	20
569-38-06	40	5	30	5	20

FIG. 12 muestra que formulaciones con relación excipiente:proteína elevada mejoraban la estabilidad fisico-química de Fab1 anti-TSLP y reducían la tasa de agregación de Fab1 anti-TSLP.

Formulación de PulmoSol que comprende Fab1 anti-TSLP

Esta parte proporciona que la composición de materiales de alimentación formulada en diferentes concentración total de sólidos totales y contenido de trileucina aumentan el rendimiento de fabricación y optimizan la formación de la envoltura. Una alta concentración de sólidos aumenta el rendimiento de la producción de polvo. En este ejemplo, el contenido de Fab1 de TSLP se fija en 50%, con una excepción, en comparación con el ejemplo anterior.

TABLA 6. Formulaciones que comprenden Fab1 anti-TSLP y trileucina

Lote nº	Contenido en sólidos	Fab1 anti-TSLP	Histidina	Trileucina	Trehalosa	Relación molar
	% p/v	% p/p	% p/p	% p/p	% p/p	Azúcar Fármaco :
728-06-01	1,5%	50,0%	5,89%	20,0%	24,1%	70,4
728-06-02	2,0%	50,0%	5,89%	15,0%	29,1%	85,0
728-06-03	2,5%	50,0%	5,89%	10,0%	34,1%	99,6

728-06-04	2,0%	50,0%	5,89%	10,0%	34,1%	99,6
728-06-05	1,5%	40,0%	4,71%	20,0%	30,3%	110,6

Formulaciones que comprenden Fab1 anti-TSLP y 15% de Trileucina

Esta parte destaca varias formulaciones diseñadas para adaptarse a la solubilidad acuosa limitada de trileucina, al tiempo que se mantiene un pH aceptable del material de alimentación y las partículas resultantes. Aquí, la trileucina se disolvió en HCl acuoso y se retro-tituló utilizando diversos medios básicos para alcanzar el pH objetivo de la solución de material de alimentación (pH 5,0-pH 5,5). Aproximadamente, se requirió una relación molar 1:1 de HCl a trileucina para disolver completamente la trileucina.

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

Tanda N°	FAB1 ANTI-TSLP	Histidina	Trehalosa	Trileucina	Ácido, HCl	Base	
	% p/v	% p/p	% p/p	% p/p	% p/p	% p/p	
569-60-01	50,0%	5,64%	26,8%	15,0%	2,56%	N/D	
569-60-02	50,0%	5,64%	19,4%	15,0%	2,56%	Histidina	7,40%
569-60-03	50,0%	5,64%	24,1%	15,0%	2,56%	KOH	2,69%
569-60-04	50,0%	5,64%	26,8%	15,0%	2,56%	NH ₄ OH	2,70%

Ejemplo 11: Afinidades de unión de Fab1 anti-TLSP a proteínas TSLP Humanas y de Cyno Determinadas por valoración en equilibrio de la solución (SET)

Se llevaron a cabo mediciones de la valoración en equilibrio de la solución (SET) para determinar las afinidades de unión de Fab1 anti-TSLP a proteínas TSLP humanas y de Cyno. El Fab se incubó a una concentración constante con diluciones seriadas de los respectivos antígenos. La afinidad de unión se extrajo de una curva de competición que se generó representando la lectura de la concentración de anticuerpo no unido frente a la concentración de antígeno aplicada. El Fab1 anti-TSLP mostró afinidades de unión en el intervalo picomolar bajo (pM) para todas las proteínas TSLP humanas y de Cyno.

Proceso de ensayo:

Veintidós diluciones 1,6ⁿ en serie de la TSLP humana (producida en células HEK) y antígenos de TSLP de cyno se prepararon en tampón de muestra y se añadió una concentración constante de Fab1. Se distribuyó un volumen de 60 µl/pocillo de cada una de las mezclas de antígeno-Fab por duplicado en una placa de microtitulación de polipropileno (MTP) de 384 pocillos. El tampón de muestra sirvió como control negativo y una muestra que solo contenía Fab1 como control positivo (Bmax). La placa se selló y se incubó durante la noche (d/n, al menos 16 h) a temperatura ambiente (TA) en un agitador.

Se recubrió con MTP una matriz MSD de 384 pocillos durante la noche a 4°C con 30 µl/pocillo de hTSLP (*producida en E. coli*) diluido en PBS a razón de 5 µg/ml, luego se lavó tres veces con 70 µl/pocillo de tampón de lavado y se bloqueó con 50 µl/pocillo de tampón de bloqueo durante 1 h a TA en un agitador. Después del lavado, se transfirió un volumen de 30 µl/pocillo de la mezcla equilibrada de antígeno-Fab desde el polipropileno MTP a la placa MSD recubierta y se incubó durante 20 min a TA.

Después de una etapa de lavado adicional, se añadieron a cada uno de los pocillos 30 µl de anticuerpo de detección etiquetado con sulfo diluido en tampón de muestra a razón de 1,8 µg/ml y se incubaron durante 30 min a TA en un agitador. La placa MSD se lavó y se añadieron 35 µl/pocillo de tampón de lectura 1x MSD y se incubaron durante 5 min a TA. Las señales ECL se generaron y midieron por el MSD Sector Imager 6000.

Se realizaron tres experimentos independientes para cada uno de los antígenos y demostraron condiciones de ensayo estables. A partir de estos experimentos, se calcularon los valores medios para las constantes de disociación en equilibrio KD y las desviaciones estándar como se muestra más adelante.

5 **TABLA 8. Constantes de afinidad (K_D) para Fab1 que se une a proteínas TSLP humanas y de cyno**

FAB	Antígeno	K _D (pM)	Nº de experimentos
Fab1	TSLP humana (HEK)	5,0 ± 2,0	3
Fab1	TSLP de cyno	1,4 ± 0,6	3

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

10 En este estudio sin GLP, el objetivo fue determinar la toxicidad potencial de Fab1, un Fab anti-linfopoyetina estromal tímica (TSLP), cuando se administra a monos cynomolgus por vía inhalatoria una vez al día durante 14 días o, como una inyección IV de dosis única el Día 1, seguida de un período sin dosificación de 13 días y una única dosis inhalada el Día 15. Además, se investigaron el perfil farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) y la inmunogenicidad (IG) de Fab1.

15 El estudio se realizó como dos componentes separadas del único estudio.

Inhalación solo: Fab1 PulmoSol en polvo, 39,7% de Fab1 en PulmoSol, se administró por inhalación a 3 grupos (3 machos/grupo) de monos cynomolgus en dosis diarias fijadas como objetivo de 1,0, 10,0 y 20,0 mg de Fab1/kg/día. Otro grupo de monos (2 machos) recibió Placebo PulmoSol en polvo y sirvió como control. Un único animal macho adicional recibió solo aire y actuó como control de aire. Se generaron aerosoles de Fab1 PulmoSol y Placebo PulmoSol utilizando un dispositivo generador de cepillo giratorio (RBG1000). Los animales se expusieron a un aerosol de Fab1 PulmoSol en polvo (Grupos 3 a 5) o Placebo PulmoSol en polvo (Grupo 2) durante un objetivo de 60 minutos una vez al día durante 14 días, utilizando una mascarilla buco-nasal ajustada. El único animal macho del Grupo 1 se expuso a aire seco filtrado solo durante la misma duración objetivo utilizando la misma configuración del equipo. Las concentraciones medias de aerosol administradas en general de Fab1 fueron 0,036, 0,31 y 0,66 mg/L para los Grupos 3, 4 y 5, respectivamente. La media general (total estimada) de las dosis administradas fue de 1,1, 9,6 y 19,9 mg de Fab1/kg/día para los Grupos 3, 4 y 5, respectivamente. El diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) confirmó que los aerosoles de Fab1 generados eran respirables para los monos y que se lograría una deposición pulmonar aceptable para las especies de prueba.

30 Intravenosa/inhalación: Se administró Fab1 a un grupo de 3 animales machos (Grupo 6) como una única inyección intravenosa en bolo a través de la vena safena el Día 1. La dosis objetivo fue 1 mg de Fab1/kg. Los animales se dejaron luego durante un periodo sin dosificación de 13 días antes de ser administrados con Fab1 PulmoSol en polvo, 39,7% de Fab1 en PulmoSol, por inhalación el Día 15. La dosis objetivo fue 20 mg de Fab1/kg. Se generó aerosol de Fab1 PulmoSol utilizando un dispositivo generador de cepillo giratorio (RBG1000). Los animales se expusieron a un aerosol de Fab1 PulmoSol en polvo durante un objetivo de 60 minutos en una sola ocasión, utilizando una mascarilla buco-nasal ajustada. A continuación, los animales se retuvieron durante 6 días antes de sacrificarlos el Día 21. La concentración de aerosol media total administrada de Fab1 fue de 0,60 mg/L. La dosis total liberada media estimada global fue de 16,3 mg de Fab1/kg/día. El diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) confirmó que el aerosol de Fab1 generado era respirable para los monos y que se lograría una deposición pulmonar aceptable para las especies de prueba.

45 Los siguientes parámetros y criterios de valoración fueron evaluados en este estudio: signos clínicos, el peso corporal, cambios en el peso corporal, parámetros de patología clínicos (hematología, coagulación y química clínica), bioanálisis para concentraciones de Fab1 y TSLP y parámetros toxicocinéticos (suero, fluido de lavado broncoalveolar (BAL), extractos de tejido pulmonar), anticuerpos anti-Fab1 (suero y fluido BAL), hallazgos macroscópicos de necropsia, pesos de órganos y exámenes histopatológicos (solo Grupos 1 a 5).

50 La administración de Fab1 durante 14 días, a través de la dosificación por inhalación, resultó en aparentes cambios dentro de la cavidad nasal (aumento de las células mucosas en el epitelio respiratorio), pulmones (acumulación alveolar difusa de macrófagos, celularidad linfoide bronquiolo-alveolar incrementada e infiltración mixta de células inflamatorias alveolares) y ganglio linfático bronquial (celularidad general incrementada) de monos cynomolgus machos. Estos cambios fueron evidentes entre los animales de todos los grupos tratados. La gravedad de los hallazgos fue de mínima a leve en todos los casos y las observaciones no se consideraron adversas.

En general, la exposición a Fab1 se demostró en todos los animales tratados con Fab1 en base a los datos de concentración en extractos de suero, broncoalveolares (BAL) y de pulmón; mientras que no se detectó Fab1 en ninguna de las muestras de animales de control a los que se administró aire o Placebo PulmoSol. Se calculó que la biodisponibilidad era aproximadamente del 0,2% después de la dosis de inhalación el Día 15. Se detectaron anticuerpos anti-Fab1 en suero solo en un animal del Grupo 4 antes de la dosis el Día 1 y en un animal del Grupo 5 el Día 14, pero se consideró que las señales observadas no tenían un impacto aparente sobre la exposición a Fab1 en estos animales. En general, no se detectó inmunogenicidad manifiesta frente a Fab1 en el estudio. No se detectó TSLP total en suero, BAL o tejido pulmonar en la mayoría de las muestras, excepto por algunas señales muy bajas detectadas en las primeras muestras de lavado (recogidas durante el proceso BAL de tres animales tratados con Fab1).

En conclusión, la administración de Fab1 a 3 monos cynomolgus como una única inyección intravenosa en bolo el Día 1, seguida de un período sin dosificación de 13 días y una única dosis inhalada el Día 15 no produjo efectos adversos. La administración por inhalación de Fab1 al mono cynomolgus durante 14 días se asoció con cambios aparentes dentro de la cavidad nasal, los pulmones y los ganglios linfáticos bronquiales de los animales de todos los grupos tratados. La gravedad de los hallazgos fue de mínima a leve en todos los casos y se consideró que las observaciones no eran adversas. Todos los animales que recibieron Fab1 se expusieron sistémicamente al elemento de prueba.

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

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

Fab1 PulmoSol en polvo se administró por inhalación a 3 grupos (3/sexo/grupo) de monos cynomolgus en dosis diarias fijadas como objetivo de 3, 10 y 22 mg/kg/día. Otro grupo de monos (3/sexo) recibió placebo PulmoSol en polvo y sirvió como control. Se mantuvieron en estudio 2 animales adicionales (2/sexo) en los grupos de Placebo y de 22 mg/kg/día durante un período de recuperación de 6 semanas. Los aerosoles de Fab1 PulmoSol y placebo PulmoSol se generaron utilizando un dispositivo generador de cepillo giratorio (RBG1000). Los animales se expusieron a un aerosol de Fab1 PulmoSol en polvo (Grupos 2 a 4) o placebo PulmoSol en polvo (Grupo 1) durante un objetivo de 60 minutos una vez al día durante al menos 92 días consecutivos, utilizando una mascarilla buco-nasal ajustada.

En este estudio se evaluaron los siguientes parámetros y criterios de valoración: signos clínicos, pesos corporales, cambios de peso corporal, exámenes oftálmicos, exámenes neurológicos (incluida la frecuencia respiratoria), electrocardiología, parámetros de patología clínica (hematología, coagulación, química clínica y análisis de orina), inmunofenotipado de linfocitos de la sangre periférica (citometría de flujo), función inmune (respuesta de anticuerpos dependiente de células T (TDAR) a la hemocianina de la lamprea bocallave (KLH)), bioanálisis para concentraciones de Fab1 y parámetros toxicocinéticos (suero y extractos de tejido pulmonar), anticuerpos anti-Fab1 (suero), hallazgos macroscópicos de necropsia, peso de los órganos y exámenes histopatológicos.

Las concentraciones medias de aerosol administradas en general de Fab1 fueron 0,10, 0,33 y 0,72 mg/L para los Grupos 2, 3 y 4, respectivamente. La media global estimada de las dosis administradas totales alcanzadas (sexos combinados) fue de 3,0, 10,1 y 22,2 mg/kg/día de Fab1 para los Grupos 2, 3 y 4, respectivamente. El diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) confirmó que los aerosoles de Fab1 generados eran respirables para los monos y que se lograría una exposición pulmonar aceptable para las especies de prueba.

No había efectos relacionados con los efectos de prueba manifiestos observados para cualquiera de los parámetros cardiovasculares tras la administración de Fab1 a dosis obtenidos de 3, 10 o 22 mg/kg/día.

Resultados para investigaciones de la función inmune (TDAR) indicaron una tendencia hacia niveles de anticuerpo IgG anti-KLH disminuidos a dosis obtenidos de $\geq 10,1$ mg/kg/día. En el último momento de muestreo (día del estudio 78), se observaron niveles reducidos de anticuerpos IgG e IgM anti-KLH a dosis alcanzadas ≥ 3 mg/kg/día. Este efecto fue más pronunciado en los machos en todos los momentos y en las hembras el día 78, pero menos prominente en las hembras en otras ocasiones de muestreo. La tendencia hacia una disminución en la respuesta anti-KLH no se consideró adversa. Los niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-KLH en los animales de recuperación del Grupo 4 (22,2 mg/kg/día) fueron más altos en todas las ocasiones en comparación con los valores de recuperación del control concurrente (Grupo 1) y similares a los del estudio principal de control (Grupo 1), que apoyan la recuperación de la disminución de la respuesta de anticuerpos anti-KLH. La administración de Fab1 durante al menos 92 días, a través de la dosificación por inhalación, resultó en una celularidad incrementada del tejido linfóide dentro de los pulmones en dosis alcanzadas de 3 mg/kg/día. La gravedad del hallazgo fue de mínima a leve en todos los casos y se consideró que no era adversa. Después de un período de recuperación de 6 semanas, el hallazgo estuvo ausente en 2/4 (50%) de los animales de recuperación y se observó en 2/4 (50%) de los animales de dosis alta con una gravedad mínima. El mismo hallazgo también estuvo presente en una hembra de recuperación de control (leve), lo que confirma que este cambio se puede encontrar ocasionalmente de forma esporádica entre los animales de control. No se detectó Fab1 en ninguna de las muestras de suero o tejido

pulmonar de los animales del grupo de control con placebo PulmoSol (Grupo 1). En general, la exposición a Fab1 se demostró durante todo el período de dosificación en animales tratados con Fab1, con un aumento relacionado con la dosis tanto en el suero como en el tejido pulmonar. La exposición sistémica en suero también se demostró durante la recuperación hasta 14-28 días después de la última dosis el día 92, mientras que las concentraciones de tejido pulmonar eran indetectables en todos los animales de recuperación en el momento de la necropsia el Día 135 (42 días después de la última dosis). Hubo una acumulación marcada en la exposición sérica a Fab1 desde el Día de Estudio 1 hasta el Día de Estudio 91 después de dosis diarias repetidas en todos los grupos de dosis. No se observaron diferencias aparentes en la exposición relacionadas con el sexo. Se observaron señales bajas pero detectables de anticuerpos anti-fármaco (ADA) en dos animales de control de placebo PulmoSol tanto en el valor de referencia pre-dosis como en el momento posterior a la dosis, probablemente debido a anticuerpos pre-existentes que no eran específicos para Fab1. No se detectaron señales de ADA en ningún otro animal de control. Todos los animales tratados con Fab1 desarrollaron señales post-dosis de ADAs tan pronto como el Día 28 de estudio en adelante. Las fuertes señales de ADA en tres animales fueron aparentemente asociadas con la pérdida de la exposición a Fab1 en el suero, pero la exposición pulmonar a Fab1 se demostró todavía en estos animales en el momento de la necropsia (1 ~ 6 horas después de la última dosis). En conclusión, la administración por inhalación de Fab1 al mono cynomolgus durante 13 semanas fue bien tolerada a niveles de dosis respirables alcanzados de hasta 22,2 mg/kg/día. Se confirmó que todos los animales que recibieron Fab1 tenían exposición a Fab1 tanto sistémicamente como en el pulmón. Los anticuerpos anti-Fab1 estaban presentes en todos los animales tratados desde el Día 28 en adelante y se asociaron con una exposición mucho menor en 3 individuos en comparación con el resto de los animales tratados. La evaluación microscópica confirmó una celularidad incrementada del tejido linfóide pulmonar para la mayoría de todos los animales tratados con Fab1, que se observó en el 50% de los animales de recuperación de dosis alta después de un período de recuperación de 6 semanas. La gravedad del hallazgo fue de mínima a leve en todos los casos y se consideró no adversa.

Ejemplo 14: Preparación de formulaciones simples secadas por pulverización de un fragmento de anticuerpo monoclonal

El fragmento de anticuerpo monoclonal Fab1 descrito en esta memoria tiene un peso molecular de 46,6 kDa. Se describen formulaciones de polvo seco para la administración local a los pulmones en el tratamiento del asma. En este contexto, el uso del término "simple" se refiere a formulaciones de ingrediente farmacéutico activo (Fab1) y tampón solamente.

Se fabricó una serie de formulaciones de anticuerpos simples que comprenden 89,5% de ingrediente farmacéutico activo y 10,5% de tampón histidina a partir de materiales de alimentación que comprenden diversas composiciones de disolvente de etanol/agua (Tabla 9). El contenido de etanol se varió entre 5% y 20% p/p. Los materiales de alimentación se secaron por pulverización en el secador por pulverización NSD con una temperatura de entrada de 105°C, una temperatura de salida de 70°C, un caudal de gas de secado de 595 L/min, un caudal de gas de atomizador de 20 L/min, un caudal de alimentación de líquido de 8,0 mL/min y un ALR de 2,5 x10³ v/v. El contenido de sólidos se fijó al 2% p/v.

TABLA 9. Impacto de los parámetros del procedimiento en las propiedades micromeríticas de formulaciones de anticuerpos simples que comprenden 89,5% de API en tampón histidina.

Lote n°	API (% p/p)	Trileucina (% p/p)	Sólidos (% p/v)	EtOH (% p/p)	PPSD (µm)			Densidad Compactada (g/cm ³)
					x10	x50	x90	
761-22-07	89,5	0	2	0	0,55	1,34	3,24	0,347
761-02-09	89,5	0	2	5	0,66	1,93	5,64	0,178
761-02-06	89,5	0	2	10	0,73	2,48	7,19	0,142
761-02-07	89,5	0	2	20	0,69	1,94	6,04	0,135

Ejemplo 15: Propiedades micromeríticas de formulaciones de anticuerpos simples secadas por pulverización

Las propiedades micromeríticas de las formulaciones de anticuerpos secadas por pulverización del Ejemplo 14 se presentan en la Tabla 9. Todas las formulaciones simples que comprenden solo API y tampón, produjeron partículas con una superficie de partículas lisa (es decir, sin ondulación de la superficie). La adición de pequeñas cantidades de etanol al material de alimentación acuoso disminuyó la densidad aparente y la compactada de los polvos (observado también para las formulaciones de insulina). Las partículas también eran relativamente grandes en términos de su distribución de tamaño de partícula primaria (PPSD).

Ejemplo 16: Rendimiento del aerosol de formulaciones de anticuerpos simples secadas por pulverización

La DD y TLD determinadas para los polvos delineados en el Ejemplo 15 se presentan en la Tabla 10. Las partículas primarias tenían un diámetro aerodinámico mediano calculado, D_a, entre 0,71 y 0,93 µm (calculado a partir de la densidad compactada y las mediciones x50 utilizando la ecuación:

$$d_a = d_g \sqrt{\rho_p}$$

El inhalador de polvo seco Concept1 es un dispositivo basado en cápsulas de baja resistencia ($R = 0,07 \text{ cm H}_2\text{O}^{1/2} / (\text{L/min})$).

TABLA 10. Rendimiento de aerosol de formulaciones de anticuerpos simples. El rendimiento del aerosol se evaluó con el inhalador Concept1 (20 mg de masa de llenado) a un caudal de 90 L/min y un volumen total de 2 L (n = 5).

Lote nº	Densidad Compactada (g/cm ³)	x50 (µm)	D _a (calc) (µm)	Morfología	DD (% ND)	TLD (% DD)
761-22-07	0,347	1,34	0,79	Lisa	64,9	65,0
761-02-09	0,178	1,93	0,81	Lisa	77,0	57,1
761-02-06	0,142	2,48	0,93	Lisa	81,2	43,7
761-02-07	0,135	1,94	0,71	Lisa	74,3	57,7

Está claro a partir de los datos de la Tabla 10 que la disminución de la densidad por sí sola es insuficiente para permitir la formación de partículas que eviten eficazmente la deposición en la boca y la garganta. Con el fin de lograr esto, la morfología de las partículas debe modificarse para aumentar la rugosidad de la superficie (ondulación) y sería deseable una disminución del tamaño de las partículas primarias.

Es interesante observar que mientras que los péptidos y las proteínas pequeñas adoptan de forma natural una morfología ondulada en ausencia de un excipiente formador de envoltura, la formulación del anticuerpo requiere la adición de un excipiente formador de envoltura para permitir la formación de partículas onduladas. A este respecto, el excipiente formador de envoltura y la adición de etanol realizan funciones similares en la modificación del grosor de la pared y la densidad de las partículas secadas por pulverización. Por tanto, el impacto de la adición de etanol es menor en presencia de un formador de la envoltura.

Ejemplo 17: Preparación y propiedades micromeríticas de formulaciones de anticuerpos secadas por pulverización en plataforma

En esta serie de polvos secados por pulverización, las condiciones de secado por pulverización se mantuvieron constantes y se evaluó el impacto de la adición de un excipiente formador de envoltura (es decir, trileucina, 0-15% p/p) para las formulaciones de anticuerpos. Estas formulaciones también contienen trehalosa como formador de vidrio (aproximadamente 29-44% p/p dependiendo del contenido de trileucina) y tampón histidina (5,9% p/p, pH 5,0).

Los polvos se secaron por pulverización en el secador por pulverización NSD personalizado con una temperatura de entrada de 105°C, una temperatura de salida de 70°C, un caudal de gas de secado de 595 L/min, un caudal de gas de atomizador de 25 L/min, un caudal de alimentación de líquido de 10,0 mL/min y un ALR de $2,5 \cdot 10^{-3}$ v/v. El contenido de sólidos se mantuvo constante en 2% p/p. Todos los polvos tenían una morfología ondulada con la excepción del lote 761-02-12, que se secó por pulverización en ausencia de un formador de envoltura y produjo partículas suaves similares a las observadas en el Ejemplo 16. Los resultados se muestran en la Tabla 11. En algunas realizaciones, la formulación de polvo seco de la presente invención comprende partículas de núcleo-envoltura que comprenden: un excipiente formador de la envoltura y un núcleo que comprende el API, excipientes formadores de vidrio y un tampón, al que a veces también se alude en esta memoria como la formulación de plataforma.

TABLA 11. Impacto de los parámetros del procedimiento en las propiedades micromeríticas de formulaciones de anticuerpos 'en plataforma' que comprenden 50,0% p/p de API, 5,9% de tampón histidina, trehalosa y trileucina.

Lote nº	API (% p/p)	Trileucina (% p/p)	EtOH (% p/p)	PPSD (µm)			Densidad Compactada (g/cm ³)
				x10	x50	x90	
728-06-04	50,0	10,0	0	0,55	2,28	5,14	0,366
728-06-02	50,0	15,0	0	0,64	2,06	4,83	0,197
761-02-12	50,0	0,0	10	0,48	1,60	4,87	0,158
761-22-06	50,0	5,0	10	0,50	1,63	3,85	0,268
761-02-11	50,0	10,0	10	0,63	2,25	5,75	0,176
761-02-10	50,0	15,0	10	0,67	2,30	5,27	0,112

Ejemplo 18: Rendimiento del aerosol de formulaciones de anticuerpo secadas por pulverización en 'plataforma' con contenido variable de trileucina

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

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

Lote nº	Etanol/Sólidos	Densidad Compactada (g/cm ³)	x50 (µm)	D _a (calc) (µm)	Morfología	DD (% ND)	TLD DD (%)
728-06-04	0	0,366	2,28	1,38	Ondulada	90,0	83,3
728-06-02	0	0,197	2,06	0,91	Ondulada	90,0	80,0
761-02-12	5	0,158	1,60	0,64	Lisa	69,0	66,2
761-22-06	5	0,268	1,63	0,84	Ondulada	89,2	79,1
761-02-11	5	0,176	2,25	0,94	Ondulada	92,3	84,8
761-02-10	5	0,112	2,30	0,77	Ondulada	93,1	83,0

Se observan mejoras significativas en la DD y la TLD para formulaciones de anticuerpos con una morfología de partículas ondulada. En realizaciones de la invención, la morfología ondulada deseada resulta de la presencia del excipiente formador de envoltura trileucina en la superficie de la partícula.

En realizaciones de la invención, las propiedades físico-químicas del material en la superficie de las partículas influyen en la morfología de las partículas. Para proteínas grandes (tales como determinadas proteínas por encima de 20.000 Dalton) se prefiere un excipiente formador de envoltura tal como trileucina para lograr la morfología deseada. En realizaciones de la invención, las partículas que forman la formulación y la composición tienen una morfología ondulada para reducir las fuerzas de cohesión entre partículas, de manera que el tamaño de los aglomerados es lo suficientemente pequeño como para que los aglomerados sean respirables.

Cuando se añade etanol, disminuye la densidad de partículas de las partículas (de lo contrario) onduladas al disminuir el grosor de la pared. Esto, a su vez, reduce la densidad compactada, permitiendo partículas primarias más pequeñas de acuerdo con las propiedades aerodinámicas deseadas. En algunas realizaciones, las partículas deben tener una densidad más baja, de modo que las partículas primarias y los aglomerados sean respirables.

Se observan reducciones significativas en la densidad compactada para las formulaciones emparejadas 728-06-04 y 761-02-11 y 728-06-02 y 761-02-10 cuando el contenido de etanol aumenta de 0% a 10% p/p. Para las formulaciones específicas de este Ejemplo, la adición de etanol al 10% solo no proporcionó la mejora objetivo en el rendimiento del aerosol con respecto a lo que proporciona el excipiente formador de envoltura. La TLD es excelente (> 80% de la DD), pero permanece por debajo del objetivo deseado del 90% p/p de la DD, en gran parte porque las partículas son demasiado grandes y densas. Para las partículas onduladas el diámetro aerodinámico primario calculado, D_a, varía de 0,77 a 1,38 µm.

Ejemplo 19: Impacto de los parámetros del procedimiento modificados (contenido de sólidos y adición de co-disolvente) sobre las propiedades micromeríticas de las formulaciones de anticuerpos en plataforma

Formulaciones que comprenden 50,0% p/p de API, 5,9% p/p de tampón histidina (pH 5,0), aproximadamente 14% p/p o 29% p/p de trehalosa y 15% p/p o 30% p/p de trileucina. Los polvos se secaron por pulverización en un secador por pulverización NSD personalizado con una temperatura de entrada de 105°C, una temperatura de salida de 70°C, un caudal de gas de secado de 595 L/min, un caudal de gas atomizador de 30 L/min, un caudal de líquido de 4,0 mL/min y un ALR de 7,5 x 10³ v/v. El contenido de sólidos se redujo al 1% p/p. Estas modificaciones en el proceso de secado por pulverización fueron diseñadas para reducir el tamaño de partícula primaria. En realizaciones de la invención, se observaron reducciones significativas en la distribución del tamaño de partícula primaria.

TABLA 13. Impacto de los parámetros del procedimiento en las propiedades micromeríticas de formulaciones de anticuerpos 'en plataforma' que comprenden 50,0% p/p de API, 5,9% de tampón histidina, trehalosa y trileucina.

Lote nº	API (% p/p)	Sólidos (% p/v)	Trileucina (% p/p)	EtOH (% p/p)	PPSD (µm)			Densidad Compactada (g/cm ³)
					x10	x50	x90	
761-22-01	50,0	1,0	15,0	5	0,39	1,33	2,59	0,282
761-22-02	50,0	1,0	15,0	10	0,51	1,31	2,59	0,232
761-22-03	50,0	1,0	15,0	20	0,53	1,36	2,94	0,151

761-02-04	50,0	1,0	15,0	30	0,55	1,44	3,15	0,162
761-22-05	50,0	1,0	30,0	20	0,64	1,58	2,94	0,122

Ejemplo 20: Impacto de los parámetros del procedimiento modificados (contenido de sólidos y adición de co-disolvente) sobre el rendimiento del aerosol de formulaciones de anticuerpos en plataforma

5 El impacto de las reducciones en el contenido de sólidos y los aumentos en ALR sobre el rendimiento del aerosol de las formulaciones de anticuerpos en plataforma se presentan en la Tabla 14. Se observaron reducciones significativas en el diámetro aerodinámico mediano de las partículas primarias con respecto a las partículas del Ejemplo 18. Esto se traduce en una TLD entre aproximadamente 94% y 98% de la DD, es decir, dentro de un intervalo objetivo de rendimiento deseado, preferido u óptimo.

10

TABLA 14. Impacto de los parámetros del procedimiento en las propiedades micromeríticas y el rendimiento del aerosol de las formulaciones de anticuerpos en plataforma. El rendimiento del aerosol se evaluó con el inhalador Concept1 (20 mg de masa de llenado) a un caudal de 90 L/min y un volumen total de 2 L (n = 5).

Lote nº	Etanol/Sólidos	Densidad Compactada (g/cm ³)	x50 (µm)	Morfología	D _a (calc) (µm)	DD (% ND)	TLD (% DD)
761-22-01	5	0,282	1,33	Ondulada	0,71	92,4	97,8
761-22-02	10	0,232	1,31	Ondulada	0,63	93,9	95,1
761-22-03	20	0,151	1,36	Ondulada	0,53	92,1	95,6
761-02-04	30	0,162	1,44	Ondulada	0,58	93,7	95,0
761-22-05	20	0,122	1,58	Ondulada	0,55	95,0	93,7

15 A menos que se defina lo contrario, las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que los que normalmente entiende un especialista familiarizado con el campo al que pertenece la divulgación.

20 A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden realizar y se han realizado de una manera conocida per se, como resultará evidente para la persona experta en la materia. Se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a los manuales estándares y a la técnica de antecedentes mencionada en esta memoria y a las referencias adicionales citadas en los mismos.

25

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

5 <120> MOLÉCULAS DE UNIÓN A LINFOPOYETINA ESTROMAL TÍMICA (TSLP) Y MÉTODOS DE UTILIZAR LAS MOLÉCULAS

<130> PAT057035-WO-PCT

10 <140>
<141>

<150> 62/342,511
<151> 2016-05-27

15 <150> 62/216,050
<151> 2015-09-09

<160> 43

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 10
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
30 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met His
1 5 10

35 <210> 2
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 2
His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15

45 Val Lys Gly

<210> 3
<211> 9
50 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

5  <400> 3
    Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser
    1             5

    <210> 4
    <211> 5
10  <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <221> fuente
15  <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

    <400> 4
    Asp Tyr Trp Met His
    1             5

20  <210> 5
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

25  <220>
    <221> fuente
    <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

    <400> 5
    Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
30  1             5

    <210> 6
    <211> 8
    <212> PRT
35  <213> Secuencia artificial

    <220>
    <221> fuente
    <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
40

    <400> 6
    Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr
    1             5

    <210> 7
45  <211> 120
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
50  <221> fuente
    <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

    <400> 7

```

ES 2 869 970 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 360

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 8

gaggttcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggttaagc ctggcggttag ccttagactt 60

agctgcgctg ctagtggctt caccttttagc gactactgga tgcactgggt tagacaggcc 120

cctggtaaag gcttggagtg ggtcggacac attaatgcta agaccgacgc cggcactacc 180

gactacgccg ctcccgttaa gggccgggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240

ctctaccttc aatgaatag ccttaagacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga 300

gaaatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcaaggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360

15 <210> 9

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 9

ES 2 869 970 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr		
			20					25					30				
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Gly	His	Ile	Lys	Ser	Lys	Thr	Asp	Ala	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ala		
	50					55					60						
Pro	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Thr		
65					70				75						80		
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr		
				85					90					95			
Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln		
			100					105					110				
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val		
		115					120					125					
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala		
	130					135					140						
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser		
145					150					155					160		
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val		
				165					170					175			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro		
			180					185					190				
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys		
		195					200					205					
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp		
	210					215					220						
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		
225					230					235					240		

ES 2 869 970 T3

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 10

<211> 1350

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 10

gaggttcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggttaagc ctggcggtag ccttagactt 60
agctgcgctg ctagtggctt cacctttagc gactactgga tgcactgggt tagacaggcc 120
cctggtaaag gcttggagtg ggtcggacac attaatgcta agaccgacgc cggcactacc 180
gactacgccg ctcccgttaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240
ctctaccttc aatgaatag ccttaagacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga 300
gaaatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcaaggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360
gctagcacta agggcccaag tgtgtttccc ctggcccca gcagcaagtc tacttccggc 420
ggaactgctg ccctgggttg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccggt gacagtgtcc 480
tggaactctg gggctctgac ttccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540
ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgaca gtgccctcca gctctctggg aaccagacc 600
tatatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
aagagctgcg acaagacca cacctgcccc ccctgcccag ctccagaact gctgggaggg 720
ccttcogtgt tcctgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag caggacccc 780
gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
agcacctaca ggggtggtgc cgtgtgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
gaatacaagt gcaaagtctc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gacaatcagc 1020
aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacacc tgccccccag ccgggaggag 1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc cagcgatata 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
ctggacagcg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggaag 1350

<210> 11

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 11

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val His

1

5

10

15 <210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

```

<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 12
Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser
5 1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
15

<400> 13
Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr Val
1 5 10

<210> 14
20 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 14
Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr
30 1 5

<210> 15
<211> 3
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

40 <400> 15
Gly Asp Asn
1

<210> 16
<211> 7
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 16
Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr
1 5

```

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 10
 <400> 17
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15

 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val
 20 25 30

 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

 Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
 65 70 75 80

 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr
 85 90 95

 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

 <210> 18
 15 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

 <400> 18
 agctacgagc tgactcagcc ccttagcggt agcgtggccc tgggtcaaac cgctagaatc 60
 acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgttcact ggtatcagca gaagcccgggt 120
 caagcccccg tgctcgtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg 180
 ttttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta totctagggc tcaggccggc 240
 gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga 300
 ggcactaagc tgaccgtgct g 321
 25
 <210> 19
 <211> 213
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 19

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser
210

10

<210> 20

<211> 639

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

5

<400> 20
 agctacgagc tgactcagcc ccttagcggt agcgtggccc tgggtcaaac cgctagaatc 60
 acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgttcact ggtatcagca gaagcccggg 120
 caagcccccg tgctcgtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg 180
 ttttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc 240
 gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga 300
 ggcactaagc tgaccgtgct gggctaacct aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360
 cccagcagcg aggagctgca ggccaacaag gccaccctgg tgtgcctgat cagcgacttc 420
 taccagggcg ccgtgaccgt ggcctggaag gccgacagca gccccgtgaa ggccggcggtg 480
 gagaccacca cccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540
 ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tcctacagct gccaggtgac ccacgagggc 600
 agcaccgtgg aaaagaccgt ggccccaacc gagtgcagc 639

<210> 21
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

15

<400> 21
 gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtcaagc ctggcggtag cctgagactg 60
 agctgcgctg ctagtggtctt cacctttagc gactactgga tgcactgggt cagacaggcc 120
 cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacac attaatgcta agaccgacgc cggcactacc 180
 gactacgccg ctctgtgaa gggccgggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240
 ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga 300
 gagatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcagggca ccctggtcac cgtgtctagc 360

20

<210> 22
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 22

ES 2 869 970 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

- 5 <210> 23
 <211> 669
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
- <400> 23

ES 2 869 970 T3

```

gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtcaagc ctggcggtag cctgagactg      60
agctgcgctg ctagtggcctt cacctttagc gactactgga tgcactgggt cagacaggcc      120
cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacac attaagtcta agaccgacgc cggcactacc      180
gactacgccg ctctgtgaa gggccgggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc      240
ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga      300
gagatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcagggca ccctggtcac cgtgtctagc      360
gctagcacta agggccctc cgtgttcctt ctggccctt ccagcaagtc tacctctggc      420
ggcaccgctg ctctgggctg cctggtgaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtgtcc      480
tggaactctg gcgccctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtccctc      540
ggcctgtact ccctgtcctc cgtggtgaca gtgccttcct ccagcctggg caccagacc      600
tatatctgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagcct      660
aagtcatgc                                     669

```

<210> 24

<211> 321

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 24

```

agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtc agcgtggccc tgggtcagac cgctagaatc      60
acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgtgcact ggtatcagca gaagcccggc      120
caggcccccg tgctgggtgat ctacggcgat aacgagcggc ctacgggaat ccccgagcgg      180
tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc      240
gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga      300
ggcactaagc tgaccgtgct g                                     321

```

15 <210> 25

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 25

ES 2 869 970 T3

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser
210

- 5 <210> 26
<211> 639
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"
- <400> 26

ES 2 869 970 T3

```

agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtc agcgtggccc tgggtcagac cgctagaatc      60
acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgtgcact ggtatcagca gaagcccggc      120
caggcccccg tgctgggtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg      180
tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc      240
gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga      300
ggcactaagc tgaccgtgct gggtcagcct aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc      360
cccagcagcg aggagctgca ggccaacaag gccaccctgg tgtgcctgat cagcgacttc      420
taccagggcg ccgtgaccgt ggcctggaag gccgacagca gccccgtgaa ggccggcgtg      480
gagaccacca cccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc      540
ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tcctacagct gccaggtgac ccacgagggc      600
agcaccgtgg aaaagaccgt ggccccaacc gagtgcagc      639

```

<210> 27
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys
 1 5 10 15
 Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr
 20 25 30
 Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser
 35 40 45
 Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn
 50 55 60
 Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln
 65 70 75 80
 Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu
 85 90 95
 Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
 100 105 110
 Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg
 115 120 125
 Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
 130 135 140
 Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
 145 150 155

<210> 28

ES 2 869 970 T3

<211> 2629
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 28
 gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa 60
 taagggtctt ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggcccct 120
 aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tggtaggaag agtttagtgt gaaactgggg 180
 tggaattggg tgtccacgta tgttcccttt tgccttacta tatgttctgt cagtttcttt 240
 caggaaaatc ttcattctac aacttgtagg gctggtgtta acttacgact tcactaactg 300
 tgactttgag aagattaaag cagcctatct cagtactatt tctaaagacc tgattacata 360
 tatgagtggg accaaaagta ccgagttcaa caacaccgtc tctttagtagc atcggccaca 420
 ttgccttact gaaatccaga gcctaacctt caatcccacc gccggctgcg cgtcgctcgc 480
 caaagaaatg ttgccatga aaactaaggc tgccttagct atctggtgcc caggctattc 540
 ggaaactcag ataaatgcta ctcaggcaat gaagaagagg agaaaaagga aagtcacaac 600

ES 2 869 970 T3

caataaatgt ctggaacaag tgtcacaatt acaaggattg tggcgtcgct tcaatcgacc	660
tttactgaaa caacagtaaa ccatctttat tatggtcata tttcacagca ccaaaataaa	720
tcacatcttat taagtagatg aaacattaac tctaactgtg acaaagaaga ccacaaatag	780
ttatctttta attacagaag agtttcttaa cttacttttg taagttttta ttgtgtaagt	840
ttataatgca ggggaagtac tactcctcaa atgttgaggg aagcttccat aacattgatg	900
actggcttca tggcagtaat tctcggctgt agttgcataa gcattgctca agaggaaaat	960
ccaaaagtgc agcaggagaa ctcttttccc tgaaaaagga aaaatattga actcaatgat	1020
agcacctaaa cttacattta aaagacagac attccttcta catgtaatga cacttcttgt	1080
gttaaaactaa aaatttaciaa gagaagaaag tgaaagcaaa tgggggtttca caaatagttg	1140
taaatatagt gaagcaatth gaataatth tcaagcaaaq tattgtgaaa gtattctaag	1200
ccaagtthta aatattatct aacagacaag agtgggtatat acaagtagat cctgagaagt	1260
acctttgtta cagctactat aaatatacat ataaattata gaatctactt taattttattt	1320
tgtgaacact tttgaaaatg tacatgttcc tttgtaatg acactatata tttcttaata	1380
aaataattct caaattttgtt tcttatgaat catctctcaa atctagttag acaatttgca	1440
cacatacttt tctaaggagac attatcttcc ttcaggtttt tacctccact catccttaga	1500
gccactgac tgctcccctt tatacctgtt ggcctgcct ataggagaga atatttgag	1560
ataggcagct tcaggatgca ttgcaatcat ccttttctta aattatgtca ctagtctttt	1620
atthtttccc ctcttgaact ttcctcacac ctggaagaaa caaagtagga aaaagtgaac	1680
aggggatgtc aaatcgattc ttgaattccc gctgcaagct agagccgcag gcacctctc	1740
actcaatttc cactcagaac cctataaaca ccagtgggaa gggcaaccga ctgcacgtgg	1800
gaatgcactg atthtttcta ggagtagaca tgttcctcta attactccct gagggttagt	1860
tggggctaaa ccatgacaga agtggggaag ttcaatgtcc ttaaattccat cttacttgcc	1920
aacaggtaag aggaagctta cattacatgt ccagtccaca tttaaagagc acttactgtg	1980
gaacaagcct tcagccaaac aatggggata gaaaagtagg taagactcag cctttgtcca	2040
gagaagctca gggatatagct gaataggcag tttcttttgt cctgaggaaa atcaggacat	2100
gcctgctttc taaaaatctt cctctgaaga cctgacccaa gctcttaaat gctattgtaa	2160
gagaaatttc tttgtctatt aactccattt tagtagggat tcaactgacta gattttactg	2220
aactatgaaa ataaatacac ataatttttc acaaaatttt gggcccaatt cccctaaaag	2280
aattgaggat tagggagaaa ggagacaact caaagtcac ccattaagtg cagtttcttt	2340
gaatcttctg ctttatcttt aaaaatttgt ataatttata tattttattc tatgtgttcc	2400
atagatatct taatgtaaaa ttagtcattt aaattacact gtcaattaaa agtaatgggc	2460
aagagattgc atcatactaa tttagtaaga acgttcccaa atgttgtaac aatgtggatc	2520
atacatctct ggttttttaa atgtattgag gctttcttgg tggactagta tagtatacgg	2580
tcagttatgt caatgtttca tgggtcaataa aaaggaagtt gcaaattgt	2629

<210> 29

<211> 63

<212> PRT

ES 2 869 970 T3

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
1 5 10 15

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg
20 25 30

Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
35 40 45

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
50 55 60

5

<210> 30

<211> 2411

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 30

accctcgcca cgcccctgct cccccgcggg tggttcttcc ttgctctact caaccctgac	60
ctcttctctc tgactctcga cttgtgttcc ccgctcctcc ctgaccttcc tcccctcccc	120
tttcaactcaa ttctcaccaa ctctttctct ctctgggtgtt ttctcctttt ctcgtaaact	180
ttgccgccta tgagcagcca cattgcctta ctgaaatcca gagcctaacc ttcaatccca	240
ccgcgggctg cgcgctcgctc gccaaagaaa tgttcgccat gaaaactaag gctgccttag	300
ctatctgggtg cccaggctat tcggaaactc agataaatgc tactcaggca atgaagaaga	360
ggagaaaaag gaaagtcaca accaataaat gtctggaaca agtgtcacia ttacaaggat	420
tgtggcgctc cttcaatcga cttttactga aacaacagta aaccatcttt attatgggtca	480
tatttcacag caccaaaata aatcatcttt attaagtaga tgaaacatta actctaactg	540
tgacaaagaa gaccacaaat agttatcttt taattacaga agagtttctt aacttacttt	600
tgtaagtttt tatttgtgtaa gtttataatg caggggaagt actactcctc aaatgttgag	660
ggaagcttcc ataacattga tgactggctt catggcagta attctcggct gtagttgcat	720
aagcattgct caagaggaaa atccaaaagt gcagcaggag aactcttttc cctgaaaaag	780
gaaaaatatt gaactcaatg atagcaccta aacttacatt taaaagacag acattccttc	840

ES 2 869 970 T3

```

tacaatgtaat gacacttctt gtgttaaact aaaaattttac aagagaagaa agtgaaagca      900
aatgggggttt cacaaatagt tgtaaatata gtgaagcaat ttgaaataat tttcaagcaa      960
agtattgtga aagtattcta agccaagttt taaatattat ctaacagaca agagtgggat      1020
atacaagtag atcctgagaa gtacctttgt tacagctact ataaatatac atataaatta      1080
tagaatctac ttttaatttat tttgtgaaca cttttgaaaa tgtacatggt cctttgtaat      1140
tgacactata tatttcttaa taaaataatt ctcaaatttg tttcttatga atcatctctc      1200
aaatctagtt agacaatttg cacacatact tttctaaggg acattatctt ccttcagggt      1260
tttacctcca ctcatcctta gagccactg actgctcccc tttatacctg ttggccctgc      1320
ctataggaga gaatatttgg agataggcag cttcaggatg cattgcaatc atccttttct      1380
taaattatgt cactagtctt ttattttttc ccctcttgaa ctttcctcac acctggaaga      1440
aaciaaagtag gaaaaagtga acaggggatg tcaaactgat tcttgaattc ccgctgcaag      1500
ctagagccgc aggcaccctc tcaactcaatt tccactcaga accctataaa caccagtggg      1560
aagggcaacc cactgcacgt gggaatgcac tgatttttcc taggagtaga catgttctctc      1620
taattactcc ctgaggggta gttggggcta aaccatgaca gaagtgggga agttcaatgt      1680
ccttaaattc atcttacttg ccaacaggta agaggaagct tacattacat gtccagtcca      1740
catttaaaga gcacttactg tggaacaagc cttcagccaa acaatgggga tagaaaagta      1800
ggtaagactc agcctttgtc cagagaagct caggggatag ctgaataggc agtttctttt      1860
gtcctgagga aaatcaggac atgcctgctt tctaaaaatc ttcctctgaa gacctgacct      1920
aagctcttaa atgctattgt aagagaaatt tctttgtcta ttaactccat tttagtaggg      1980
attcactgac tagattttac tgaactatga aaataaatac acataatttt tcacaaaatt      2040
ttggggccaa ttcccctaaa agaattgagg attagggaga aaggagacaa ctcaaagtca      2100
tcccattaag tgcagtttct ttgaatcttc tgctttatct ttaaaaaatt gtataattta      2160
tatattttat tctatgtgtt ccatagatat cttaatgtaa aattagtcat ttaaattaca      2220
ctgtcaatta aaagtaatgg gcaagagatt gcatcactact aatttagtaa gaacgttccc      2280
aaatgttgta acaatgtgga tcatacatct ctggtttttt aaatgtattg aggcctttctt      2340
ggtggactag tatagtatac ggtcagttat gtcaatgttt catggtcaat aaaaaggaag      2400
ttgcaaattg t      2411

```

```

<210> 31
<211> 131
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

```

```

<400> 31
Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Glu Ala Asp Tyr Leu
1          5          10          15

```

ES 2 869 970 T3

Arg Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser
20 25 30

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

Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Pro Arg Cys Ala Ser
50 55 60

Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Arg Lys Thr Lys Ala Thr Leu Ala Leu
65 70 75 80

Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met
85 90 95

Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln
100 105 110

Val Ser Gln Leu Leu Gly Leu Trp Arg Arg Phe Ile Arg Thr Leu Leu
115 120 125

Lys Lys Gln
130

<210> 32

<211> 393

<212> ADN

<213> Macaca fascicularis

<400> 32

tacgacttca ccaactgcga cttcgagaag atcgaggccg actacctgag aaccatcagc 60

aaggacctga tcacctacat gagcggcacc aagagcaccg acttcaacaa caccgtgtcc 120

tgagcaaca gacccactg cctgaccgag atccagagcc tgaccttcaa cccaccccc 180

agatgtgcc gctggccaa agagatgttc gccagaaaga ccaaggccac cctggccctg 240

tggtgtcccg gctacagcga gacacagatc aacgccacac aggccatgaa gaagcggcgg 300

aagcggaaag tgaccaccaa caagtgcctg gaacaggtgt cacagctgct ggggctgtgg 360

cggcggttca tccggaccct gctgaagaag cag 393

<210> 33

<211> 140

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Met Val Leu Leu Arg Ser Leu Phe Ile Leu Gln Val Leu Val Arg Met

1 5 10 15

ES 2 869 970 T3

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

Ile Tyr Cys Asn Ile Ile Phe His Asp Leu Thr Gly Asp Leu Lys Gly
35 40 45

Ala Lys Phe Glu Gln Ile Glu Asp Cys Glu Ser Lys Pro Ala Cys Leu
50 55 60

Leu Lys Ile Glu Tyr Tyr Thr Leu Asn Pro Ile Pro Gly Cys Pro Ser
65 70 75 80

Leu Pro Asp Lys Thr Phe Ala Arg Arg Thr Arg Glu Ala Leu Asn Asp
85 90 95

His Cys Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Glu Arg Asn Asp Gly Thr Gln Glu
100 105 110

Met Ala Gln Glu Val Gln Asn Ile Cys Leu Asn Gln Thr Ser Gln Ile
115 120 125

Leu Arg Leu Trp Tyr Ser Phe Met Gln Ser Pro Glu
130 135 140

<210> 34

<211> 1143

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 34

cacgttcagg cgacagcatg gttcttctca ggagcctctt catcctgcaa gtactagtag	60
ggatggggct aacttacaac ttttctaact gcaacttcac gtcaattacg aaaatatatt	120
gtaacataat ttttcatgac ctgactggag atttgaaagg ggctaagttc gagcaaatcg	180
aggactgtga gagcaagcca gcttgtctcc tgaaaatcga gtactatact ctcaatccta	240
tccctggctg cccttcactc cccgacaaaa catttgcccg gagaacaaga gaagccctca	300
atgaccactg cccaggctac cctgaaactg agagaaatga cggtagctcag gaaatggcac	360
aagaagtcca aaacatctgc ctgaatcaaa cctcacaaat tctaagattg tggtagtctc	420
tcatgcaatc tccagaataa aattagcttt cagcttctgc tatgaaaatc tctatcttgg	480
ttttagtggg cagaatacta aggggtgtgac acttagagga ccactggtgt ttattcttta	540
attacagaag ggattcttaa cttatctttt ggcataatcg ttttttcagt ataggtgctt	600
taaatgggaa atgagcaata gaccgttaat ggaaatatct gtactgttaa tgaccagctt	660
ctgagaagtc tttctcacct cccctgcaca caccttactc tagggcaaac ctaactgtag	720

ES 2 869 970 T3

taggaagaga attgaaagta gaaaaaaaa attaaaacca atgacagcat ctaaaccctg	780
tttaaaaggc aaggattttt ctacctgtaa tgattcttct aacattccta tgctaagatt	840
ttaccaaaga agaaaatgac agttcgggca gtcactgccca tgatgaggtg gtctgaaaga	900
agattgtgga atctgggaga aactgctgag atcatattgc aaatccagct gtcaaaggg	960
tcagaccag gacagtacaa ttcgtgagca gatctcaaga gccttgacaca tctacgagat	1020
atatatttaa agttgtagat aatgaatttc taatttattt tgtgagcact tttggaaata	1080
tacatgctac tttgtaatga atacatttct gaataaagta attctcaagt ttgaaaaaa	1140
aaa	1143

<210> 35

<211> 1146

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 35

actcttgcca ggcacctccc tcctgtgggt tgattccgtt ttcctcttct caactgactc	60
tggtattctga taccagacac cttcctggtg tctttccctc ctatcccat ccccttccct	120
gtccctttca ttcaattttt aatatctggc gggtttttt ttttttttct ctctctctga	180
actgtgccgc ttgtgagcag ccagcttgtc tcctgaaaat cgagtactat actctcaatc	240
ctatccctgg ctgcccttca ctccccgaca aaacatttgc cgggagaaca agagaagccc	300
tcaatgacca ctgcccaggc taccctgaaa ctgagagaaa tgacggtact caggaaatgg	360
cacaagaagt ccaaaacatc tgcctgaatc aaacctcaca aattctaaga ttgtggtatt	420
ccttcatgca atctccagaa taaaattagc tttcagcttc tgctatgaaa atctctatct	480
tggttttagt ggacagaata ctaagggtgt gacacttaga ggaccactgg tgtttattct	540
ttaattacag aagggattct taacttattt tttggcatat cgcttttttc agtatagggtg	600
ctttaaatgg gaaatgagca atagaccgtt aatggaaata tctgtactgt taatgaccag	660
cttctgagaa gtctttctca cctcccctgc acacacctta ctctagggca aacctaaactg	720
tagtaggaag agaattgaaa gtagaaaaaa aaaattaaaa ccaatgacag catctaaacc	780
ctgtttaaaa ggcaaggatt tttctacctg taatgattct tctaacattc ctatgctaag	840
attttaccaa agaagaaaat gacagttcgg gcagtcactg ccatgatgag gtggtctgaa	900
agaagattgt ggaatctggg agaaactgct gagatcatat tgcaaatcca gctgtcaaag	960
ggttcagacc caggacagta caattcgtga gcagatctca agagccttgc acatctacga	1020
gatatatatt taaagttgta gataatgaat ttctaattta ttttgtgagc acttttgga	1080
atatacatgc tactttgtaa tgaatacatt tctgaataaa gtaattctca agtttgaaaa	1140
aaaaaa	1146

<210> 36

<211> 136

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

ES 2 869 970 T3

<400> 36

Met Val Leu Phe Arg Tyr Leu Phe Ile Leu Gln Val Val Arg Leu Ala
1 5 10 15

Leu Thr Tyr Asn Phe Ser Asn Cys Asn Phe Glu Met Ile Leu Arg Ile
20 25 30

Tyr His Ala Thr Ile Phe Arg Asp Leu Leu Lys Asp Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Leu Phe Asp Gln Ile Glu Asp Cys Asp Ser Arg Thr Ala Cys Leu Leu
50 55 60

Lys Ile Asp His His Thr Phe Asn Pro Val Pro Gly Cys Pro Ser Leu
65 70 75 80

Pro Glu Lys Ala Phe Ala Leu Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ile Asn Tyr
85 90 95

Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Glu Arg Asn Gly Thr Leu Glu Met Thr
100 105 110

Arg Glu Ile Arg Asn Ile Cys Leu Asn Gln Thr Ser Gln Ile Leu Gly
115 120 125

Leu Trp Leu Ser Cys Ile Gln Ser
130 135

<210> 37

5 <211> 1125

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 37

tcaggcaaca gcatggttct ttccaggtac ctctttatcc tgcaagtggc acggctggca 60

ctaacttaca acttttctaa ctgtaacttc gagatgattt tgagaatata tcatgcaaca 120

atttttctgt acctgcttaa agatttgaat gggatcttgt tcgaccaaata cgaggactgt 180

gacagcagga cagcttgtct cctgaaaatc gaccaccata ccttcaatcc tgtccctggc 240

tgcccgtcac tccccgagaa agcgttcgct ttgaaaacga aagcggccct cattaactac 300

tgcccaggct actctgaaac tgagagaaat ggtactctgg aaatgacacg agaaatcaga 360

10 aacatctgcc tgaatcaaac ctcacaaatt ctaggattgt ggctttcctg cattcaatct 420

tgaagaaaaa attagctttt ggattatatt atgaaaatat atatcttggt tttagtagat 480
 ataatactaa ggggtgtgaca cttaaaagaa cactaatgtt tattctttaa ttatagaagg 540
 gattcttaac ttatttttgg catatcgttg tttagtgtag gcgctttaa tggaatatga 600
 gcattacccc tttaatggaa ataaccgtgc tgtaaatgat tggcttcggc ttctgagcag 660
 tctttctcac ctcacctgag acactttact ctagggcaaa cctaactgta gtaggaagaa 720
 aatcaaaagt agaaaaacag ttgaaaccaa tgacaggatc tatactccat ttaaaaggca 780
 agaatttttg tacctgtaat gattcttcta acattcctac gctaagattt tactaaagaa 840
 gaaaataaca gcagaggaaa gtgttcaggc agtcactgcc atgatgaagc tgtcagaatc 900
 tgagagctac tgctgcaact gatcgtgtag taaatccagc tgtaaagggg atcttaaccc 960
 accacagtgg gatgcacagg cagatcccca agggcattgt gcagctgtga gatatatatt 1020
 taaagttgta tataatgatt ttctaattta ttccgtgagc accttgaaa atatacatgt 1080
 cgctgtgtaa caaatacact tctgaataaa gtaattctca agttc 1125

<210> 38

<211> 149

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 38

Met Gly Ser Ser His His His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln
 1 5 10 15

Gly Pro Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala
 20 25 30

Tyr Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr
 35 40 45

Lys Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His
 50 55 60

Cys Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu
 85 90 95

Ala Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln
 100 105 110

ES 2 869 970 T3

Ala Met Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu
115 120 125

Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro
130 135 140

Leu Leu Lys Gln Gln
145

<210> 39

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota = "Descripción de Desconocido: Potencial sitio de escisión de furina"

<400> 39

Arg Arg Lys Arg

1

15 <210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Etiqueta 6xHis sintética"

<400> 40

His His His His His His

25 1 5

<210> 41

<211> 131

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

35 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 41

Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu

1

5

10

15

Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser

20

25

30

ES 2 869 970 T3

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

Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser
50 55 60

Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile
65 70 75 80

Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met
85 90 95

Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln
100 105 110

Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu
115 120 125

Lys Gln Gln
130

<210> 42

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 42

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

15

<210> 43
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 43
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr
 85 90 95
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) humana, seleccionado de una cualquiera de los siguientes:

a) un fragmento de anticuerpo que comprende:

una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 1 (HCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 2 (HCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

una región determinante de la complementariedad de cadena pesada 3 (HCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 (LCDR1) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 2 (LCDR2) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y

una región determinante de la complementariedad de cadena ligera 3 (LCDR3) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13,

en donde las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se definen de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat,

y en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab;

b) un fragmento de anticuerpo que comprende:

una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

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

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

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

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

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

en donde las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se definen de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia,

y en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab;

c) un fragmento de anticuerpo que comprende

una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;

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

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

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

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

una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13,

en donde las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se definen de acuerdo con la combinación de los esquemas de numeración de Chothia y Kabat;

y en donde el fragmento de anticuerpo es un Fab.

2. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

3. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

4. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

5. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el Fab es un Fab humano.

6. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la molécula se une a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 100 pM.

7. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la molécula se une a TSLP humana con una constante de disociación (K_D) de menos de 10 pM.

8. Una composición farmacéutica que comprende el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en donde el fragmento de anticuerpo es de aproximadamente 5% a aproximadamente 95%, o de aproximadamente 10% a aproximadamente 90%, o de aproximadamente 15% a aproximadamente 85%, o de aproximadamente 20% a aproximadamente 80%, o de aproximadamente 25% a aproximadamente 75%, o de aproximadamente 30% a aproximadamente 70%, o de aproximadamente 40% a aproximadamente 60%, o aproximadamente 40-50% (p/p) de la composición.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la composición comprende un agente formador de envoltura.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde el agente formador de envoltura es trileucina o leucina.
12. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde la composición comprende al menos un excipiente formador de vidrio.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en donde el al menos un excipiente formador de vidrio se selecciona de histidina, trehalosa, manitol, sacarosa, citrato de sodio o una mezcla de trehalosa y manitol.
14. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en donde la composición comprende un tampón.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en donde el tampón se selecciona de un tampón histidina, glicina, acetato o fosfato.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 14 o 15, en donde el tampón es aproximadamente 5-13% de la composición.
17. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, en donde la composición se formula como una formulación de polvo seco.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en donde la composición se formula como una formulación de polvo seco adecuada para inhalación.
19. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 18, en donde la composición farmacéutica comprende partículas secadas por pulverización que comprenden una envoltura y un núcleo, en donde la envoltura comprende trileucina o leucina, y el núcleo comprende:
- i) el fragmento de anticuerpo, trehalosa, manitol y un tampón; o
 - ii) el fragmento de anticuerpo, trehalosa, tampón y HCl.
20. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, en donde el tampón se selecciona de un tampón histidina, glicina, acetato o fosfato.
21. Una composición farmacéutica que comprende partículas secadas por pulverización, que comprende:
- i) un núcleo que comprende trehalosa, manitol, histidina y un fragmento de anticuerpo de unión a TSLP, o un núcleo que comprende trehalosa, histidina, HCl y un fragmento de anticuerpo de unión a TSLP, en donde el fragmento de anticuerpo de unión a TSLP es un fragmento Fab de anticuerpo que comprende:
 - a) una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; en donde las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se definen de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat,
 - o
 - b) una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;

una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y
una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
en donde las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se definen de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, o

5 c) una HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
una HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
una HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
una LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
10 una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y
una LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
en donde las HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 se definen de acuerdo con la combinación de los
esquemas de numeración de Chothia y Kabat;

y
15 ii) una envoltura que comprende trileucina o leucina.

22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, que comprende:

20 a) 40% (p/p) de fragmento de anticuerpo de unión a TSLP, 25% (p/p) de trileucina, 30% (p/p) en peso combinado de trehalosa y manitol, y 5% (p/p) de histidina;

b) 50% (p/p) de fragmento de anticuerpo de unión a TSLP, 15% (p/p) de trileucina, 2,6% (p/p) de HCl, 5,6% (p/p) de histidina y 26,8% (p/p) en peso combinado de trehalosa y una base; o

25 c) 50% (p/p) de fragmento de anticuerpo de unión a TSLP, 15% (p/p) de trileucina, 19,4% (p/p) de trehalosa, 13,04% (p/p) de histidina y 2,56% (p/p) de HCl.

23. Un kit que comprende el fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 22, y un dispositivo para administrar el fragmento de anticuerpo
30 o la composición farmacéutica a un sujeto.

24. El kit de la reivindicación 23, en donde el dispositivo suministra el fragmento de anticuerpo o la composición farmacéutica en forma de aerosol.

35 25. El kit de la reivindicación 24, en donde dicho dispositivo es un inhalador de polvo seco.

26. El fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8-22 para su uso como un medicamento.

40 27. El fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 22 para uso en el tratamiento del asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, rinitis alérgica, rinosinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, esofagitis eosinofílica o dermatitis atópica.

45 28. El fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 22 para uso en el tratamiento del asma.

29. El fragmento de anticuerpo o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en donde el fragmento de anticuerpo se formula como una formulación de polvo seco adecuada para inhalación.

50 30. El fragmento de anticuerpo o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en donde el fragmento de anticuerpo se ha de administrar al sujeto por vía oral o intranasal.

55 31. El fragmento de anticuerpo o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 30, en donde el fragmento de anticuerpo se ha de administrar al sujeto en forma de aerosol..

32. El fragmento de anticuerpo o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 31, en donde el fragmento de anticuerpo se ha de administrar al sujeto mediante un inhalador de polvo seco.

60 33. El fragmento de anticuerpo o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 32, en donde el sujeto es un ser humano.

34. El fragmento de anticuerpo o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 33, en donde un segundo agente se ha de administrar adicionalmente al sujeto, opcionalmente en donde el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides, broncodilatadores, antihistamínicos, antileucotrienos e inhibidores de PDE-4.
- 5 35. Un ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
36. El ácido nucleico de la reivindicación 35, que comprende:
- 10 a) SEQ ID NO: 21;
- b) SEQ ID NO: 24;
- c) SEQ ID NO: 23; o
- 15 d) SEQ ID NO: 26.
37. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 35 o 36.
- 20 38. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 35 o 36 o el vector de la reivindicación 37.
39. Un método de producir el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, comprendiendo el método:
- 25 cultivar una célula huésped que expresa un ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo; y recoger el fragmento de anticuerpo del medio de cultivo.
40. Un método para preparar una formulación de polvo seco que comprende el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, comprendiendo el método:
- 30 (a) proporcionar una solución acuosa que comprende el fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, trileucina o leucina, un excipiente formador de vidrio y un tampón;
- (b) secar por pulverización la solución acuosa de la etapa (a) a una temperatura en el intervalo (entrada) entre aproximadamente 120°C y aproximadamente 200°C y en el intervalo (salida) entre 55°C y aproximadamente 75°C para producir partículas de polvo seco; y
- 35 (c) recoger las partículas de polvo seco.
41. El método de la reivindicación 40, en el que el tampón se selecciona de un tampón histidina, glicina, acetato o fosfato.
- 40 42. El método de la reivindicación 40 o 41, en el que el excipiente formador de vidrio se selecciona de histidina, histidina HCl, trehalosa, manitol, sacarosa, citrato de sodio o una mezcla de trehalosa y manitol.
43. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en donde la relación de masa de excipiente:fragmento de anticuerpo es mayor que 0,5.
- 45

Fig. 1A

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGF^{*}TF^{***}SD^{*}Y^{*}W^{*}M^{*}H^{*}W^{*}R^{*}Q^{*}A^{*}P^{*}G^{*}K^{*}G^{*}L^{*}E^{*}W^{*}V^{*}G^{*}H^{*}I^{*}E^{*}S^{*}K^{*}T^{*}D^{*}A^{*}G^{*}T^{*}T^{*}D^{*}Y^{*}A^{*}A^{*}P^{*}V^{*}K
GR^{*}FT^{*}IS^{*}RD^{*}DS^{*}K^{*}NT^{*}LY^{*}L^{*}Q^{*}M^{*}N^{*}S^{*}L^{*}K^{*}T^{*}ED^{*}T^{*}A^{*}V^{*}Y^{*}Y^{*}C^{*}AP^{*}RI^{***}Y^{*}Y^{*}Y^{*}Y^{*}AP^{*}DS^{*}W^{*}G^{*}Q^{*}GL^{*}V^{*}T^{*}V^{*}S^{*}S^{*}A^{*}S^{*}T^{*}K^{*}G^{*}P^{*}S^{*}V^{*}F^{*}PL^{*}AP^{*}S
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNGGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSNTKVDKRVKSC (SEQ ID NO: 22)

Fig. 1B

SYELTQPLSVSVALGQTARITCSG^{***}D^{*}N^{*}I^{*}G^{*}S^{*}K^{*}Y^{*}V^{*}H^{*}W^{*}Y^{*}Q^{*}Q^{*}K^{*}P^{*}G^{*}Q^{*}A^{*}P^{*}V^{*}L^{*}V^{*}I^{*}Y^{*}G^{*}D^{*}N^{*}E^{*}R^{*}P^{*}S^{*}G^{*}T^{*}P^{*}E^{*}R^{*}F^{*}S^{*}G^{*}S^{*}N^{*}S^{*}G^{*}N^{*}T^{*}A^{*}T^{*}L^{*}T^{*}I^{*}S
 RAQAGDEADYYCQA^{*}A^{*}D^{*}W^{*}V^{*}D^{*}F^{*}Y^{*}V^{*}F^{*}G^{*}G^{*}T^{*}K^{*}L^{*}T^{*}V^{*}L^{*}G^{*}Q^{*}P^{*}K^{*}A^{*}P^{*}S^{*}V^{*}T^{*}L^{*}F^{*}F^{*}P^{*}S^{*}E^{*}E^{*}L^{*}Q^{*}A^{*}N^{*}K^{*}A^{*}T^{*}L^{*}V^{*}C^{*}L^{*}I^{*}S^{*}D^{*}F^{*}Y^{*}P^{*}G^{*}A^{*}V^{*}T^{*}V^{*}A^{*}N^{*}K
 ADSSFVKAGVETTTPSKQSNNEYAASSYLSTFEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 25)

Fig. 2

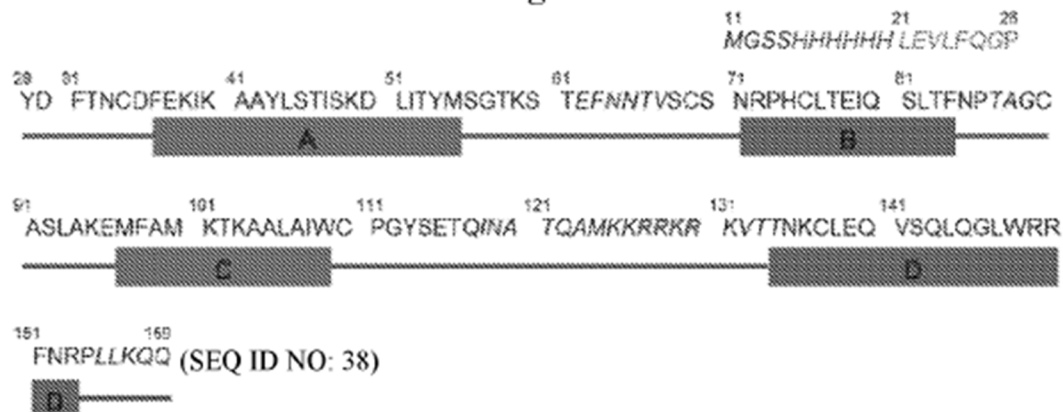


Fig. 3

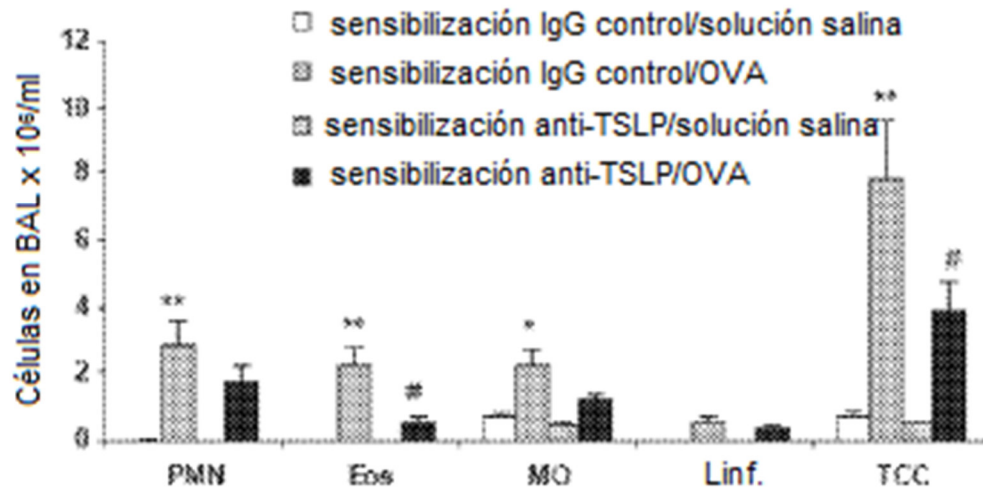


Fig. 4A

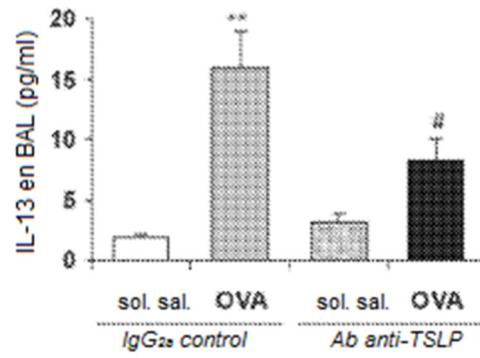


Fig. 4B

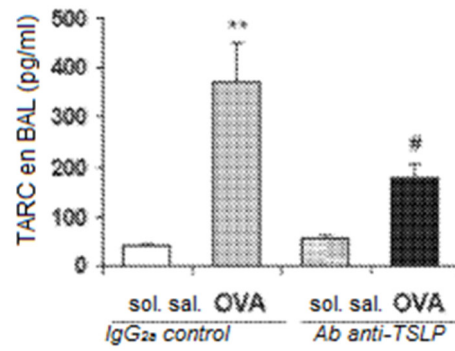


Fig. 4C

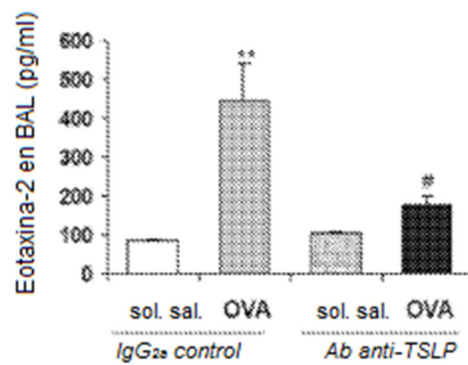


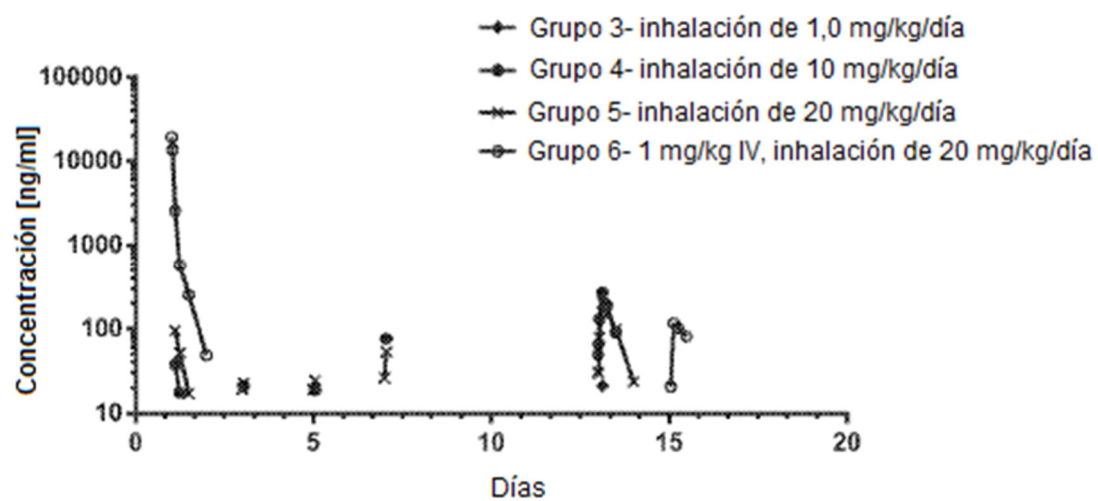
Fig. 5

Fig. 6A

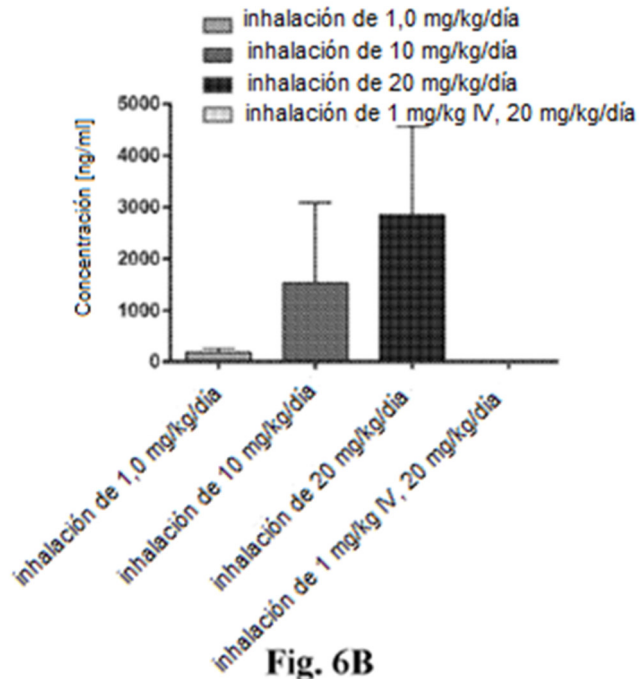


Fig. 6B

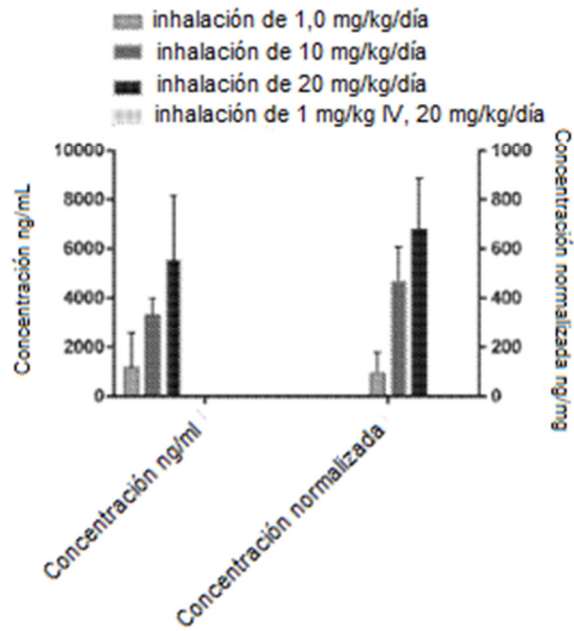


Fig. 7

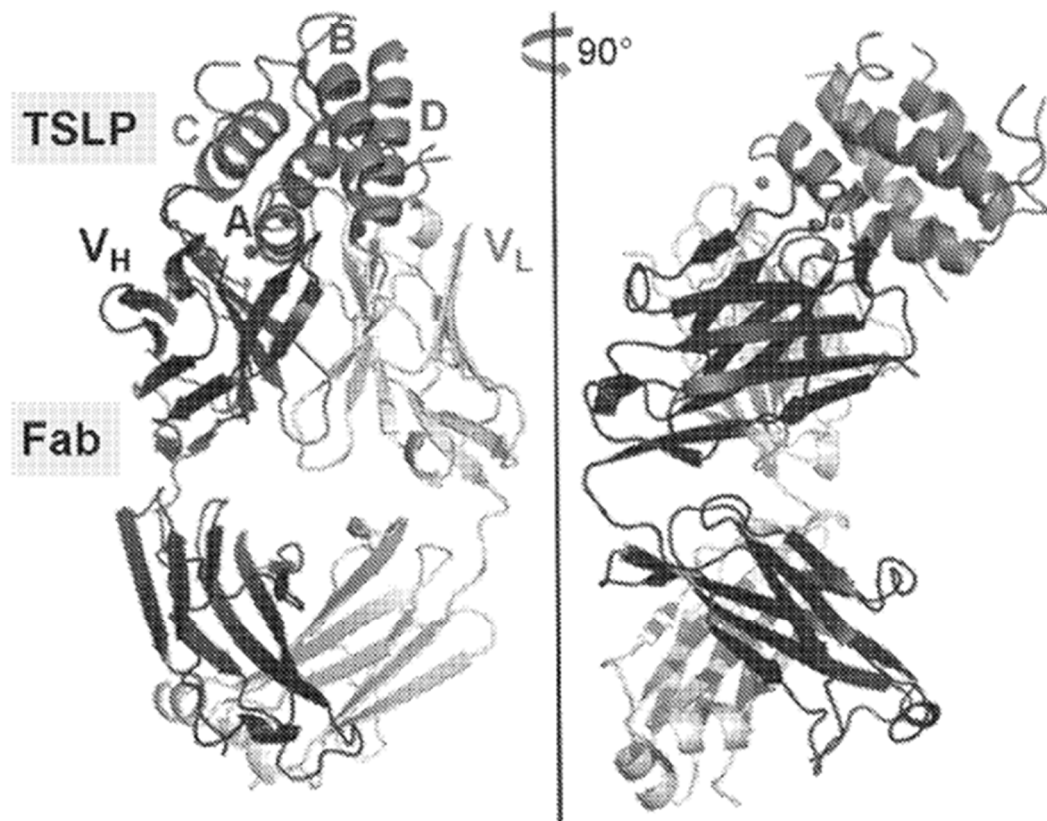
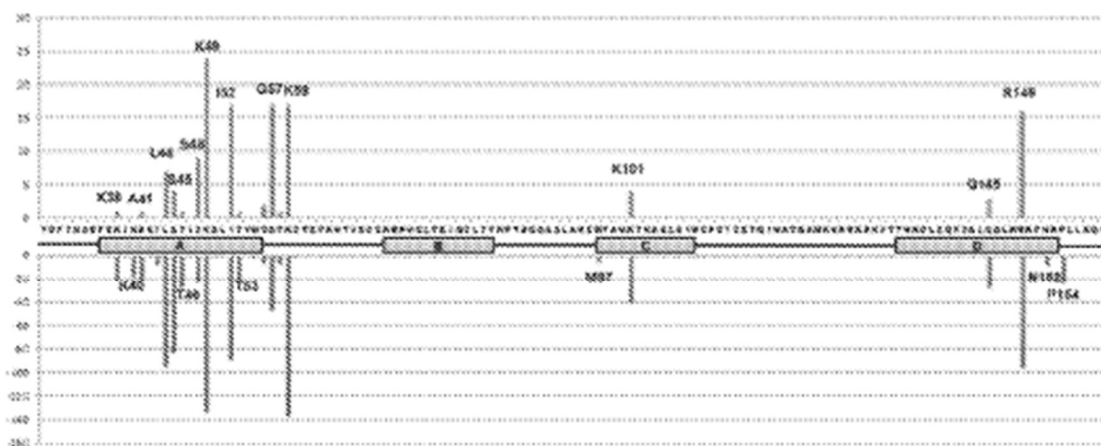


Fig. 8

Nº de contactos intermoleculares directos ($\leq 4,0$ Å)



Reducción en superficie accesible a disolvente ($\text{\AA}^2$)

Fig. 9

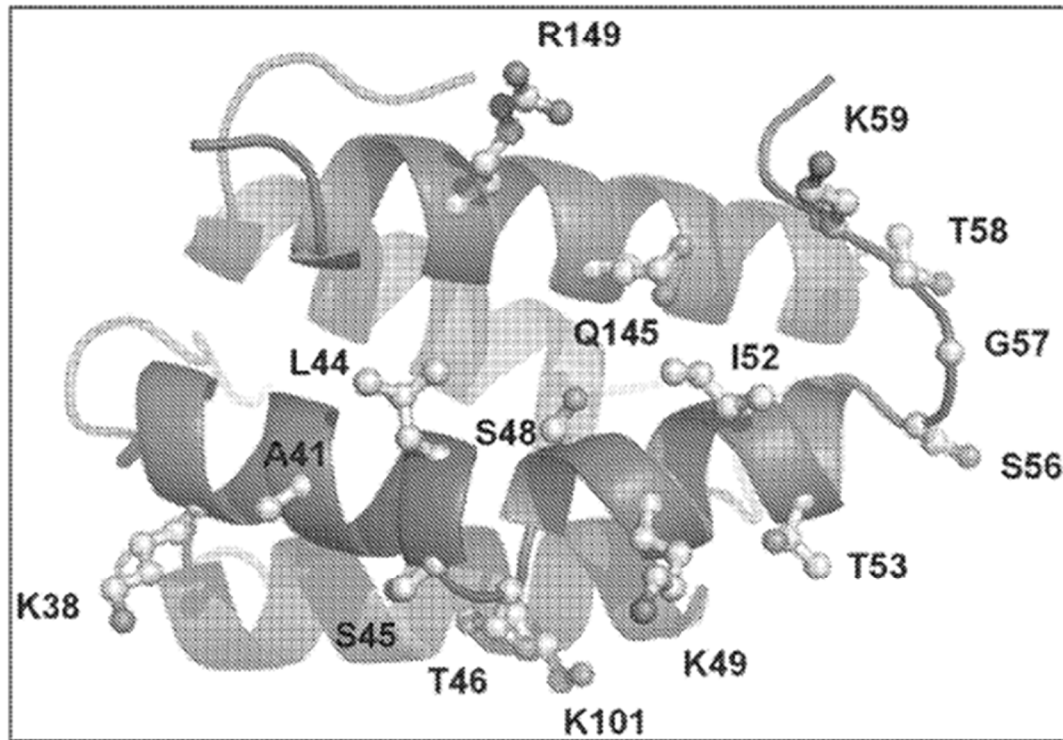


Fig. 10A

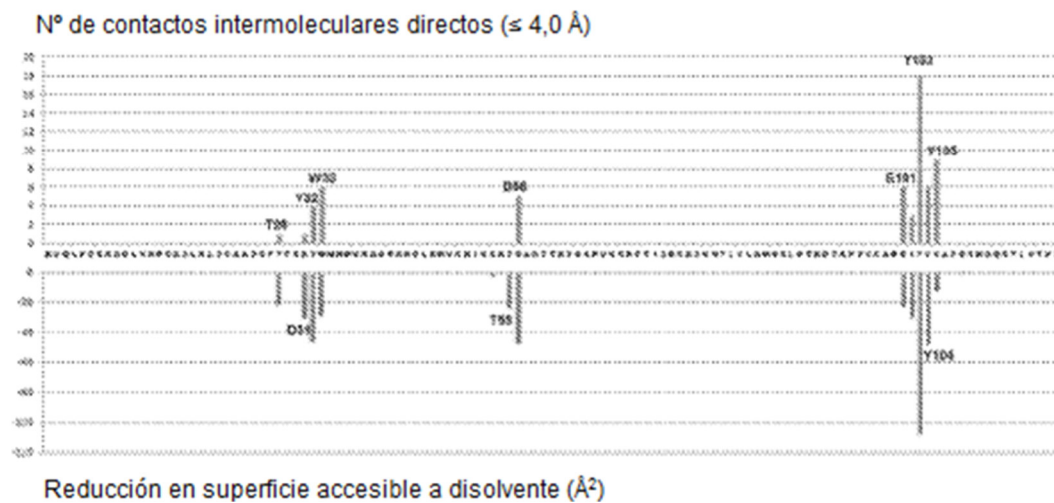


Fig. 10B

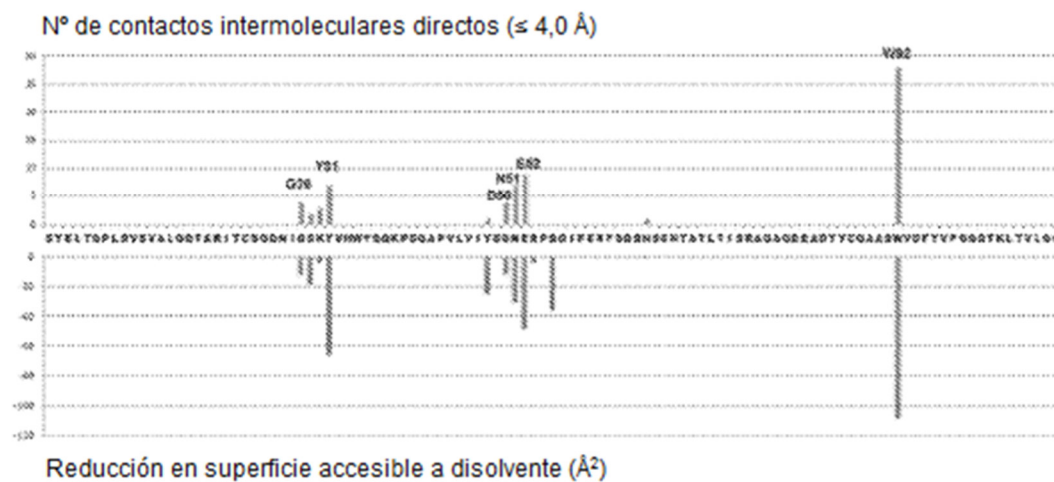


Fig. 11A

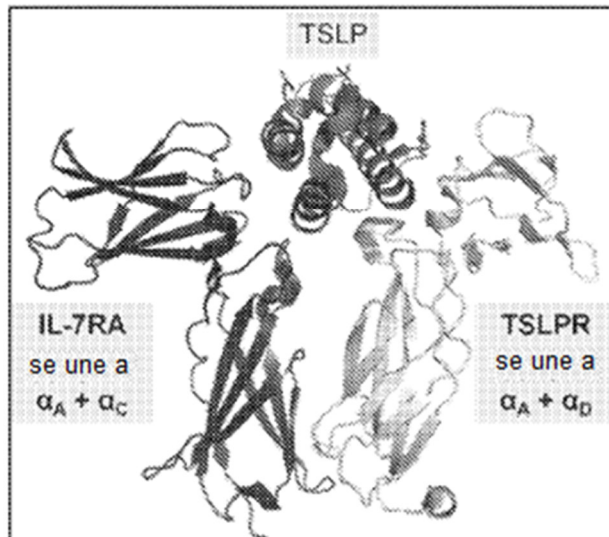


Fig. 11B

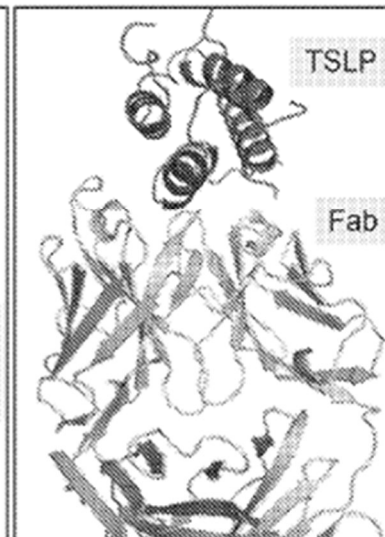


Fig. 11C

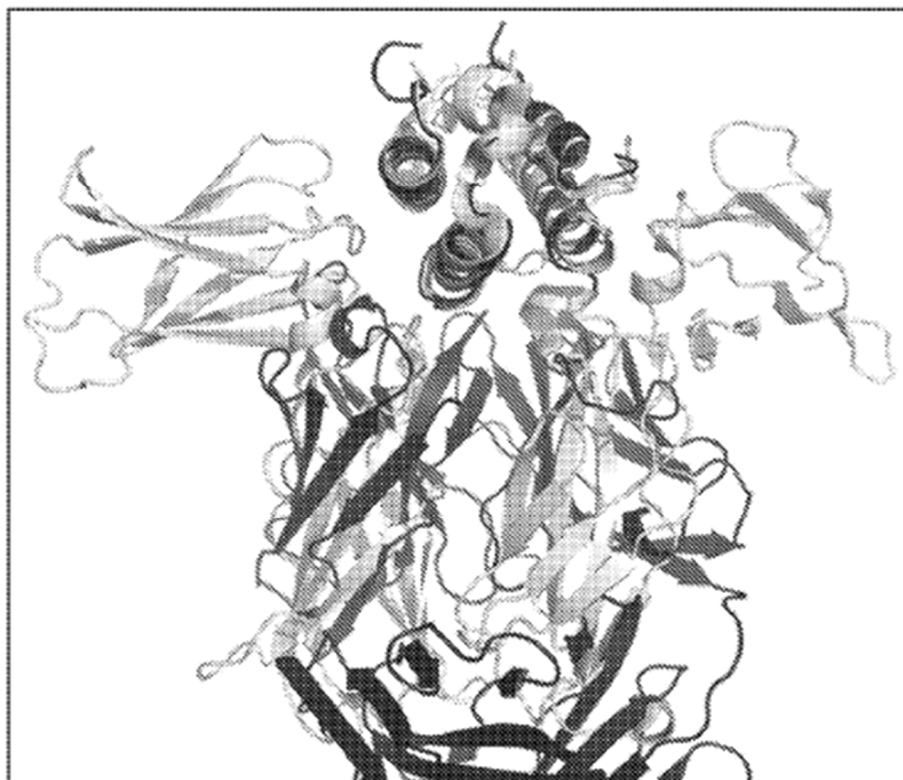


Fig. 12