

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 903 412**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2017 PCT/EP2017/067923**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2018 WO18011420**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2017 E 17746011 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 3484921**

(54) Título: **Anticuerpos anti-IL-22R**

(30) Prioridad:

15.07.2016 GB 201612337

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2022

(73) Titular/es:

**ARGENX BVBA (100.0%)
Industriepark 7
9052 Zwijnaarde, BE**

(72) Inventor/es:

**BLANCHETOT, CHRISTOPHE FREDERIC
JEROME;
URSØ, BIRGITTE;
SKAK-NIELSEN, TINE;
BERTELSEN, MALENE;
VAN DER WONING, SEBASTIAN;
SAUNDERS, MICHAEL y
DE HAARD, JOHANNES JOSEPH WILHELMUS**

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 903 412 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 anti-IL-22R

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al receptor de citocinas IL-22R, particularmente IL-22R humano. Los anticuerpos para IL-22R y los fragmentos de unión a antígeno de la invención presentan propiedades distintas, en particular distintas combinaciones de propiedades, en comparación con los anticuerpos para IL-22R descritos en la técnica anterior.

Antecedentes de la invención

IL-22R (también conocido como IL-22R1 e IL-22RA) es un receptor de citocinas de tipo II expresado selectivamente en la piel y las células epiteliales. Este receptor media en la señalización a través de tres citocinas: interleucina 22 (IL-22), interleucina 20 (IL-20) e interleucina 24 (IL-24). La señalización de citocinas a través del IL-22R precisa la formación de complejos heterodiméricos en la superficie celular. Como se muestra en la Figura 1, La IL-22 se une a y envía señales a través de un complejo que consiste en IL-22R e IL-10R β (también conocido como IL-10R2), mientras que IL-20 e IL-24 se unen y señalizan a través de un complejo heterodimérico que consiste en IL-22R e IL-20R β (también conocido como IL-20R2).

La interleucina-22 es una citocina expresada por células inmunitarias, particularmente linfocitos T y células dendríticas activadas. Una vez producida por el sistema inmunitario, IL-22 ejerce sus efectos biológicos al unirse y activar IL-22R en las células epiteliales. La activación del complejo IL-22R-IL-10R β aguas abajo de la unión de IL-22 conduce a respuestas proinflamatorias, a la inducción de proteínas antimicrobianas que son cruciales para la defensa del hospedador contra patógenos bacterianos y a efectos protectores en algunos órganos tales como los pulmones y el hígado. También se ha implicado a IL-22 en la patología de enfermedades, particularmente en el desarrollo de trastornos inflamatorios tales como la psoriasis, la artritis psoriásica y la dermatitis atópica (Ma *et al.* J Clin. Invest. 118: 597-607 (2008); Van Belle *et al.* J Immunol. 1 de enero; 188(1): 462-9 (2012); Sabat *et al.* Nat. Rev. Drug Discov. 13(1): 21-38 (2014)).

La estructura cristalina de la IL-22 formando complejo con el dominio extracelular de IL-22R se ha resuelto y ha proporcionado importantes conocimientos sobre cómo este ligando se asocia con su receptor (Jones *et al.* Estructura 16(9): 1333-1344 (2008)). La región extracelular de IL-22R incluye dos dominios de fibronectina tipo III (FBNIII) (D1 y D2) orientados aproximadamente en ángulos rectos entre sí. Cinco bucles ubicados en la interfaz de estos dominios son los principales responsables de la interacción con los restos de IL-22 en el complejo ligando-receptor. Los restos de IL-22 que contribuyen a la unión al receptor se agrupan en dos sitios del ligando, el sitio 1a y el sitio 1b. Los conocimientos sobre los restos cruciales aportados tanto por el receptor como por el ligando han revelado formas en las que esta interacción podría interrumpirse para anular la señalización de IL-22 como estrategia terapéutica.

La interleucina 20 y la interleucina 24 se expresan en monocitos y queratinocitos y son similares a la IL-22, se ha descubierto que estas citocinas desempeñan un papel en la homeostasis y patología de la piel. De ello se desprende que las estrategias para inhibir o reducir la señalización aguas abajo del IL-22R mediante el bloqueo de la unión de los ligandos que activan este receptor podrían tener utilidad terapéutica, particularmente en el tratamiento de afecciones de la piel tales como psoriasis y dermatitis atópica.

Se han desarrollado anticuerpos que se unen a IL-22R y bloquean la interacción entre IL-22 e IL-22R. Por ejemplo, el documento WO2011/061119 describe un anticuerpo para IL-22R humanizado producido a partir de un anticuerpo monoclonal antihumano de ratón descrito originalmente en el documento WO2006/047249. Se demostró que este anticuerpo humanizado, que se denominará en el presente documento "280-346-TSY", inhibe la señalización de IL-22 a través de IL-22RA en un ensayo de proliferación celular e inhibe la inflamación del oído inducida por IL-23 en un modelo de psoriasis de ratón. Los anticuerpos anti-IL-22R también se describen en el documento WO2004/085476.

Dondelinger *et al.* ((2018) Understanding the significance and implications of antibody numbering and antigenbinding surface/residue definition, Frontiers in Immunology, 9, 2278), describen el efecto de una mutación en la región marco conservada de los anticuerpos que puede alterar la afinidad de unión. Rudikoff *et al.* ((1982) Single amino acid substitution altering antigenbinding specificity, PNAS, 79, 1979-1983), describen el efecto de una sustitución de un solo aminoácido en una región determinante de complementariedad de una proteína mutante de mieloma de unión a fosfocolina.

60 Sumario de la invención

La presente invención mejora el estado de la técnica al proporcionar anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen al receptor de citocinas IL-22R y presentan propiedades que son distintas de las de los anticuerpos para IL-22R descritos en la técnica anterior. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos presentan normalmente combinaciones de propiedades que son distintas y en determinados casos

superiores, a las propiedades de los anticuerpos para IL-22R de la técnica anterior, particularmente el anticuerpo para IL-22R humanizado descrito en el documento WO2011/061119. Las propiedades de estos anticuerpos pueden ser particularmente ventajosas con respecto al uso en terapia humana, particularmente para el tratamiento de afecciones tales como la psoriasis, la artritis psoriásica y la dermatitis atópica.

5 La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une a IL-22R, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera y donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una combinación de secuencias de CDR de cadena pesada variable: HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 36; y HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 34, y una combinación de secuencias de CDR de cadena ligera variable: LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 54; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 47; y LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 16.

10 15 Además, en el presente documento se describe en general un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al IL-22R humano, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítopo dentro de la proteína IL-22R que no incluye la Tyr60.

20 En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos poseen una o más propiedades adicionales seleccionadas de las siguientes:

25 (i) la capacidad de unirse a un epítopo de IL-22R humano ubicado al menos en parte en el dominio D2 de la proteína IL-22R;
 (ii) la capacidad de unirse al IL-22R humano con alta afinidad;
 (iii) la capacidad de bloquear la unión de IL-22 a IL-22R humano;
 (iv) la capacidad de inhibir la activación de IL-22R dependiente de IL-22;
 (v) la capacidad de inhibir la activación de IL-22R dependiente de IL-20;
 (vi) la capacidad de inhibir la activación de IL-22R dependiente de IL-22 e IL-20; y
 (vii) la falta de reactividad cruzada con IL-22R murino.

30 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden presentar una alta homología humana, como se define en otra parte en el presente documento. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) donde los dominios VH y/o VL o una o más regiones determinantes de complementariedad (las CDR) de los mismos se obtienen de un animal de la familia *Camelidae*, es decir, se obtienen de camélido. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que presentan una alta homología humana o que tienen al menos una secuencia de CDR, dominio VH y/o VL obtenidos de camélido pueden ser variantes humanizadas o con modificaciones de estirpe germinal (*germlined*) de dominios VH o VL de anticuerpos convencionales de camélido, donde las expresiones "humanizado" y "con modificaciones de estirpe germinal" son como se definen en otra parte del presente documento.

35 40 45 En ejemplos no limitantes, en el presente documento se describen los siguientes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se definen por referencia a características estructurales específicas, es decir, secuencias de aminoácidos especificadas de las CDR (una o más de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 9, 11, 13, 34, 36, 41, 43 (las CDR de cadena pesada) o las SEQ ID NO: 16, 18, 20, 23, 25, 27, 47, 54, 57, 59 (las CDR de cadena ligera)) o dominios variables completos (una o más de las SEQ ID NO: 29, 31, 63, 65 (dominios variables de cadena pesada) o las SEQ ID NO: 30, 32, 62, 64, 66 (dominios variables de cadena ligera)). Todos estos anticuerpos se unen al receptor de citocinas IL-22R humano.

50 En realizaciones particulares, los anticuerpos definidos por las siguientes características estructurales pueden presentar una alta homología humana, como se define en el presente documento. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales producidos por medios recombinantes. Las CDR de los siguientes anticuerpos para IL-22R pueden obtenerse de camélido, es decir, obtenidas de anticuerpos convencionales producidos por inmunización de camélidos (específicamente, de llama). La invención también proporciona variantes humanizadas o con modificaciones de estirpe germinal humana, variantes de afinidad y variantes que contienen sustituciones conservativas de aminoácidos, como se define en el presente documento.

55 60 Los ejemplos de los anticuerpos para IL-22R descritos en el presente documento se describen ahora adicionalmente con referencia a las características estructurales.

65 En un ejemplo descrito en el presente documento, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al receptor de citocinas IL-22R, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una CDR3 de cadena pesada seleccionada de:

- la SEQ ID NO: 6 [VGFSGTYYSES], o variante de secuencia de la misma
- la SEQ ID NO: 13 [PPGPFKAHYNGMKY], o variante de secuencia de la misma,
- la SEQ ID NO: 43 [PPGPFKAHYNGAKY], o variante de secuencia de la misma,

donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

5 El dominio variable de cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender alternativamente o además una CDR2 de cadena ligera seleccionada de:

- la SEQ ID NO: 4 [SIYNDGSNTAYSDSVKG], o variante de secuencia de la misma,
- la SEQ ID NO: 11 [GIHISGGITYYLDSVKG], o variante de secuencia de la misma,
- 10 la SEQ ID NO: 36 [SIYNDASNTAYSDSVKG], o variante de secuencia de la misma,
- la SEQ ID NO: 41 [GIHISGGITYYTDSVKG], o variante de secuencia de la misma,

donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

15 El dominio variable de cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender alternativamente o además una CDR1 de cadena ligera seleccionada de:

- la SEQ ID NO: 2 [SYDMS], o variante de secuencia de la misma,
- 20 la SEQ ID NO: 9 [SYFMS], o variante de secuencia de la misma,
- la SEQ ID NO: 34 [SYDMN], o variante de secuencia de la misma,

donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

25 De forma alternativa o adicional, los anticuerpos o fragmento de unión a antígeno de los mismos, que se unen al receptor de citocinas IL-22R, pueden comprender un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una CDR3 de cadena ligera seleccionada de:

30 la SEQ ID NO: 20 [QSGSSSANAV], o variante de secuencia de la misma,

- la SEQ ID NO: 27 [ASYRLYADYV], o variante de secuencia de la misma,
- la SEQ ID NO: 54 [QSGSSSSNAV], o variante de secuencia de la misma,

35 donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

El dominio variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender alternativamente o además una CDR2 de cadena ligera seleccionada de:

40 la SEQ ID NO: 18 [GNNNRPS], o variante de secuencia de la misma,

- la SEQ ID NO: 25 [KVNRSS], o variante de secuencia de la misma,
- la SEQ ID NO: 47 [GQNNRPS], o variante de secuencia de la misma,
- la SEQ ID NO: 59 [EVNKRSS], o variante de secuencia de la misma,

45 donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

El dominio variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender alternativamente o además una CDR1 de cadena ligera seleccionada de:

50 la SEQ ID NO: 16 [QGGYYAH], o variante de secuencia de la misma

- la SEQ ID NO: 23 [TGTSDIGDYNYVS], o variante de secuencia de la misma,
- la SEQ ID NO: 57 [TGTSSDIGSYNYVS], o variante de secuencia de la misma,

55 donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

En determinados ejemplos, se describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al receptor de citocinas IL-22R, comprendiendo el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo una combinación de CDR3 de cadena pesada variable (HCDR3), CDR2 de cadena pesada variable (HCDR2) y CDR1 de cadena pesada variable (HCDR1) donde la combinación se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 36; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 34;
- 65 (ii) HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 43; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 41; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 9;

- (iii) HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 4; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 2; y
 (iv) HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 13; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 11; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 9.

5 De forma alternativa o adicional, los anticuerpos o fragmento de unión a antígeno de los mismos, que se unen al receptor de citocinas IL-22R pueden comprender una combinación de CDR3 de cadena ligera variable (LCDR3), CDR2 de cadena ligera variable (LCDR2) y CDR1 de cadena ligera variable (LCDR1) seleccionada del grupo que consiste en:

- 10 (i) LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 54; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 47; LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 16;
 (ii) LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 27; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 59; LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 57;
 15 (iii) LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 20; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 47; LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 16;
 (iv) LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 20; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 18; LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 16; y
 20 (v) LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 27; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 25; LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 23.

En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen al receptor de citocinas IL-22R, donde los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno comprenden una combinación de CDR3 de cadena pesada variable (HCDR3), CDR2 de cadena pesada variable (HCDR2) y CDR1 de cadena pesada variable (HCDR1), CDR3 de cadena ligera variable (LCDR3), CDR2 de cadena ligera variable (LCDR2) y CDR1 de cadena ligera variable (LCDR1) de acuerdo con los ejemplos descritos a continuación.

25 La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al receptor de citocinas IL-22R y comprende la combinación de secuencias de CDR de VH y VL: HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 36; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 34; LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 54; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 47; y LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 16.

30 35 En un ejemplo, en el presente documento se describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al receptor de citocinas IL-22R y comprende la combinación de secuencias de CDR de VH y VL: HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 43; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 41; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 9; LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 27; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 59; y LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 57.

40 45 En un ejemplo, en el presente documento se describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al receptor de citocinas IL-22R y comprende la combinación de secuencias de CDR de VH y VL: HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 4; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 2; LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 20; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 47; y LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 16.

50 En un ejemplo, en el presente documento se describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al receptor de citocinas IL-22R y comprende la combinación de secuencias de CDR de VH y VL: HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 4; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 2; LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 20; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 18; y LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 16.

55 En un ejemplo, en el presente documento se describe un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al receptor de citocinas IL-22R y comprende la combinación de secuencias de CDR de VH y VL: HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 13; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 11; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 9; LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 27; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 25; y LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 23.

60 65 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen al receptor de citocinas IL-22R, donde los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) seleccionado de lo siguiente:

- (i) un VH que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o 31
 (ii) una variante de afinidad o variante con modificaciones de estirpe germinal humana de un VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o 31; o
 (iii) un VH que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el

85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 29 o 31.

5 De forma alternativa o adicional, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden comprender un dominio variable de cadena ligera (VL) seleccionado de lo siguiente:

- (i) un VL que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, 32 o 62
- (ii) una variante de afinidad o variante con modificaciones de estirpe germinal humana de un VH que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, 32 o 62; o
- 10 (iii) un VL que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, 32 o 62.

15 Para las realizaciones donde los dominios de los anticuerpos o de los fragmentos de unión a antígeno se definen mediante un porcentaje particular de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, los dominios VH y/o VL pueden conservar secuencias de CDR idénticas a las presentes en la secuencia de referencia, de modo que la variación está presente solo dentro de las regiones marco conservadas.

20 En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden incluir el dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 de un anticuerpo humano, en particular de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

Los anticuerpos particularmente preferidos de la presente invención se describen a continuación.

230C9 y anticuerpos relacionados con el mismo

25 En determinados ejemplos, se proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-22R, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno un dominio variable de cadena pesada donde:

30 la secuencia de CDR3 de cadena pesada variable es la SEQ ID NO: 6 [VGFSGTYYSES] o una variante de secuencia de la misma;
la secuencia de CDR2 de cadena pesada variable es la SEQ ID NO: 36 [SIYNDASNTAYSDSVKG] o una variante de secuencia de la misma; y
la secuencia de CDR1 de cadena pesada variable es la SEQ ID NO: 34 [SYDMN] o una variante de secuencia de la misma, y
35 donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

40 El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender además un dominio variable de cadena ligera donde:

- la secuencia de CDR3 de cadena ligera variable es la SEQ ID NO: 54 [QSGSSSSNAV] o una variante de secuencia de la misma;
- 45 la secuencia de CDR2 de cadena ligera variable es la SEQ ID NO: 47 [GQNNRPS] o una variante de secuencia de la misma; y
- la secuencia de CDR1 de cadena ligera variable es la SEQ ID NO: 16 [QGGYYAH] o una variante de secuencia de la misma, y
donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

50 En la presente invención, se proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-22R, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno un dominio variable de cadena pesada donde:

55 la secuencia de CDR3 de cadena pesada variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 6 [VGFSGTYYSES];
la secuencia de CDR2 de cadena pesada variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 36 [SIYNDASNTAYSDSVKG];
la secuencia de CDR1 de cadena pesada variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 34 [SYDMN]; la secuencia de CDR3 de cadena ligera variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 54 [QSGSSSSNAV];
60 la secuencia de CDR2 de cadena ligera variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 47 [GQNNRPS]; y
la secuencia de CDR1 de cadena ligera variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 16 [QGGYYAH].

65 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63 y opcionalmente un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64. En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a

antígeno de los mismos, que comprenden un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo el dominio variable de cadena pesada una secuencia de VH con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 63 y/o el dominio variable de cadena ligera que comprende una VL con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 64. Para las realizaciones donde los dominios de los anticuerpos o de los fragmentos de unión a antígeno se definen mediante un porcentaje particular de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, los dominios VH y/o VL pueden conservar secuencias de CDR idénticas a las presentes en la secuencia de referencia, de modo que la variación está presente solo dentro de las regiones marco conservadas. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden dominios variables de cadena pesada y/o dominios variables de cadena ligera definidos por tener un porcentaje particular de identidad con las SEQ ID NO: 63 y 64, respectivamente, tendrán las siguientes secuencias de CDR:

- 15 una secuencia de CDR3 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:6 [VGFSGTYYSES];
- 20 una secuencia de CDR2 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:36 [SIYNDASNTAYSDSVKG];
- 25 una secuencia de CDR1 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:34 [SYDMN];
y
una secuencia de CDR3 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:54 [QSGSSSSNAV];
una secuencia de CDR2 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:47 [GQNNRPS];
y
una secuencia de CDR1 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:16 [QGGYYYAH].

Los anticuerpos que se unen específicamente a IL-22R pueden comprender al menos una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa y/o al menos una cadena ligera lambda o kappa de longitud completa. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68. En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales que comprenden una cadena pesada con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 67 y/o una cadena ligera con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 68. Para las realizaciones donde las cadenas de los anticuerpos se definen mediante un porcentaje particular de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden conservar secuencias de CDR idénticas a las presentes en la secuencia de referencia, de modo que la variación está presente solo fuera de las regiones CDR.

223G5 y anticuerpos relacionados con el mismo

En determinados ejemplos, se proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-22R, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno un dominio variable de cadena pesada donde:

- 50 la secuencia de CDR3 de cadena pesada variable es la SEQ ID NO: 43 [PPGPFAHYNGAKY] o una variante de secuencia de la misma;
- 55 la secuencia de CDR2 de cadena pesada variable es la SEQ ID NO: 41 [GIHISGGITYYTDSVKG] o una variante de secuencia de la misma; y
la secuencia de CDR1 de cadena pesada variable es la SEQ ID NO: 9 [SYFMS] o una variante de secuencia de la misma, y
donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede comprender además un dominio variable de cadena ligera donde:

- 60 la secuencia de CDR3 de cadena ligera variable es la SEQ ID NO: 27 [ASYRLYADYV] o una variante de secuencia de la misma;
- 65 la secuencia de CDR2 de cadena ligera variable es la SEQ ID NO: 59 [EVNKRSS] o una variante de secuencia de la misma; y
la secuencia de CDR1 de cadena ligera variable es la SEQ ID NO: 57 [TGTSSDIGSYNYVS] o una variante de secuencia de la misma, y
donde la variante de secuencia comprende una, dos o tres sustituciones de aminoácidos (por ejemplo,

sustituciones conservativas, sustituciones de humanización o variantes de afinidad) en la secuencia mencionada.

En determinados ejemplos descritos en el presente documento, se proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-22R, comprendiendo dicho anticuerpo o

5 fragmento de unión a antígeno un dominio variable de cadena pesada donde:

la secuencia de CDR3 de cadena pesada variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 43 [PPGPFKAHYNGAKY];

10 la secuencia de CDR2 de cadena pesada variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 41 [GIHISGGITYYTDSVKG];

la secuencia de CDR1 de cadena pesada variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 9 [SYFMS]; la secuencia de CDR3 de cadena ligera variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 27 [ASYRLYADYV];

15 la secuencia de CDR2 de cadena ligera variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 59 [EVNKRSS]; y

la secuencia de CDR1 de cadena ligera variable comprende o consiste en la SEQ ID NO: 57 [TGTSSDIGSYNYVS].

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65 y opcionalmente un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66. En determinados

20 ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo el dominio variable de cadena pesada una secuencia de VH con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 65

25 y/o el dominio variable de cadena ligera que comprende una VL con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 66.

30 Para las realizaciones donde los dominios de los anticuerpos o de los fragmentos de unión a antígeno se definen mediante un porcentaje particular de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, los dominios VH y/o VL pueden conservar secuencias de CDR idénticas a las presentes en la secuencia de referencia, de modo que la variación está presente solo dentro de las regiones marco conservadas. En determinados ejemplos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden dominios variables de cadena pesada y/o dominios variables de cadena ligera definidos por tener un porcentaje particular de identidad con las SEQ ID NO: 65 y 66, respectivamente,

35 tendrán las siguientes secuencias de CDR:

una secuencia de CDR3 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:43 [PPGPFKAHYNGAKY];

40 una secuencia de CDR2 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:41 [GIHISGGITYYTDSVKG];

una secuencia de CDR1 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:9 [SYFMS];

una secuencia de CDR3 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:27 [ASYRLYADYV];

45 una secuencia de CDR2 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:59 [EVNKRSS]; y

una secuencia de CDR1 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la SEQ ID NO:57 [TGTSSDIGSYNYVS].

Los anticuerpos que se unen específicamente a IL-22R pueden comprender al menos una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa y/o al menos una cadena ligera lambda o kappa de longitud completa. En determinados ejemplos, los anticuerpos comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos monoclonales que comprenden una cadena pesada con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 69 y/o una cadena ligera con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 70.

60 Para las realizaciones donde las cadenas de los anticuerpos se definen mediante un porcentaje particular de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden conservar secuencias de CDR idénticas a las presentes en la secuencia de referencia, de modo que la variación está presente solo fuera de las regiones CDR.

65 Cuando se identifique que anticuerpos, o regiones de unión a antígenos, particulares comprenden una combinación de un dominio VH o cadena pesada, definida por referencia a una secuencia de aminoácidos específica, y un

dominio VL o una cadena ligera, también definida por referencia a una secuencia de aminoácidos específica, entonces, para cada combinación específica de VH/VL o de cadena pesada/cadena ligera enumerada (a menos que se indique otra cosa), puede considerarse que esta definición incluye anticuerpos o regiones de unión a antígeno, formados por la combinación de un dominio VH/cadena pesada que tiene al menos el 85 %, al menos el 90 %, al

5 menos el 95 %, al menos el 97 %, o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada/VH indicada y un dominio VL/cadena ligera que tiene al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, o al menos el 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de VL/cadena ligera indicada. En cada caso, los dominios/cadenas definidas por un % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos del dominio/cadena indicados

10 pueden conservar secuencias de CDR idénticas a las presentes en las secuencias de aminoácidos del dominio VH/VL o de la cadena pesada/ligera indicadas, a la vez que presentan variación en la secuencia de aminoácidos dentro de las regiones marco conservadas u otras regiones fuera de las regiones CDR.

A menos que se indique otra cosa en la presente solicitud, el % de identidad de secuencia entre dos secuencias de 15 aminoácidos puede determinarse comparando estas dos secuencias alineadas de una manera óptima y en que la secuencia de aminoácidos a comparar puede comprender adiciones o delecciones con respecto a la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las que el resto aminoacídico es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de 20 comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias. Por ejemplo, es posible utilizar el programa BLAST, "Secuencias BLAST 2" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, siendo los parámetros utilizados los proporcionados 25 por defecto (en particular para los parámetros "penalización por apertura de hueco": 5, y "penalización por extensión de hueco": 2; siendo la matriz elegida, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), calculándose el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar directamente mediante el programa.

Los anticuerpos para IL-22R o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente 30 documento pueden presentar cada una, o cualquier combinación, de las siguientes propiedades/características:

- el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se puede unir a un epítopo dentro de la proteína IL-22R humana que no incluye la Tyr60;
- el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede unirse a un epítopo ubicado al menos en parte en el dominio D2 de la proteína IL-22R humana, donde el dominio D2 es los restos de aminoácidos 125 a 228 de la SEQ ID NO: 71;
- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede unirse a IL-22R humano con alta afinidad;
- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede bloquear la unión de IL-22 a IL-22R;
- el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno puede inhibir la activación de IL-22R dependiente de IL-22;
- el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno puede inhibir la activación de IL-22R dependiente de IL-20;
- 40 - el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno puede inhibir la activación de IL-22R dependiente de IL-22 y la activación de IL-22R dependiente de IL-20;
- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno podría no reaccionar de forma cruzada con IL-22R murino.

Los anticuerpos para IL-22R o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente 45 documento presentan preferentemente dos o más de las siguientes propiedades/características:

- el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une a un epítopo dentro de la proteína IL-22R humana que no incluye la Tyr60;
- el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a IL-22R humano con alta afinidad;
- 50 - el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno inhibe la activación de IL-22R dependiente de IL-22 y la activación de IL-22R dependiente de IL-20.

Los anticuerpos para IL-22R o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, proporcionados en el presente documento, pueden ser anticuerpos químéricos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos contienen la región bisagra, el dominio CH2 y/o el dominio CH3 de una IgG humana. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos presentan una alta homología con una IgG humana, preferentemente una IgG1 humana, donde "alta homología humana" es como se define en otra parte del presente documento. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) donde los dominios VH y/o VL o una o más regiones determinantes de complementariedad (las CDR) de los mismos se obtienen de un animal de la familia Camelidae, es decir, se obtienen de camélido, preferentemente donde el camélido es una llama.

En aspectos adicionales, la invención también proporciona moléculas polinucleotídicas que codifican los anticuerpos 65 y fragmentos de unión a antígeno enumerados anteriormente de la invención, además de los vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos, células hospedadoras que contienen los vectores y métodos de

expresión/producción recombinante de los anticuerpos de la invención.

En un aspecto adicional más, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos para IL-22R o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, y un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto más de la invención se refiere a los anticuerpos para IL-22R o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención para su uso como medicamento, particularmente en la profilaxis y/o el tratamiento de afecciones tales como la psoriasis, la artritis psoriásica y la dermatitis atópica.

Estas y otras realizaciones de la invención se apreciarán y comprenderán mejor cuando se consideren junto con la siguiente descripción y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra los distintos complejos receptores que median en la señalización a través de las citocinas IL-22, IL-20 e IL-24. IL-22R es capaz de formar un complejo heterodimérico con dos compañeros receptores distintos, IL-10R β (o IL-10R2) e IL-20R β (o IL-20R2), y la activación de estos distintos complejos por la unión del ligando desencadena la señalización a través de rutas intracelulares aguas abajo.

La **Figura 2** muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de IL-22R humano (SEQ ID NO: 71).

La **Figura 3** muestra la secuencia de nucleótidos de longitud completa que codifica a IL-22R humano (SEQ ID NO: 72).

La **Figura 4** muestra la inhibición de la señalización mediada por IL-22 e IL-20 a través de IL-22R en ensayos de proliferación basados en células. **(A)** Se muestra el efecto de los mAb (forma siglada de *monoclonal antibody*, anticuerpo monoclonal) para IL-22R sobre la proliferación de la línea celular BW-hIL-22R. Las células BW-hIL-22R expresan de manera estable el IL-22R humano y el crecimiento se inhibe/detiene en respuesta al ligando IL-22. Los anticuerpos capaces de bloquear la interacción entre IL-22 y hIL-22R alivian la inhibición del crecimiento mediada por la unión ligando-receptor. **(B)** Se muestra el efecto de los mAb para IL-22R sobre la proliferación de la línea celular Baf3-hIL-22R/IL20Rb. Las células Baf3-hIL-22R/IL20Rb expresan de manera estable los componentes del complejo receptor IL-22R/IL20Rb de manera que las células proliferan en presencia de IL-20. Los anticuerpos capaces de bloquear la interacción entre IL-20 y este complejo receptor inhiben la proliferación inducida por la unión del ligando.

La **Figura 5** muestra el alineamiento del dominio extracelular de IL-22R de diversas especies. **(A)** muestra las secuencias EST parciales disponibles en Genbank; **(B)** muestra las secuencias determinadas después de la clonación de IL-22R de cinomolgo y rhesus a partir de la biblioteca de ADNc de mono cinomolgo.

La **Figura 6** muestra los resultados de los experimentos de ELISA competitivo llevados a cabo para mapear los epítopos de los mAb para IL-22R. Se identificaron una diversidad de epítopos para los anticuerpos de las familias de VH 1-8, 10, 11, 19 y 22. Los epítopos se agruparon de acuerdo a si los anticuerpos (i) bloquearon la unión de IL-22 *in vitro* y neutralizaron la señalización de IL-22 en un ensayo basado en células (cuadrante inferior izquierdo); (ii) bloquearon la unión de IL-22 *in vitro*, pero no tuvieron actividad neutralizante en el ensayo basado en células (cuadrante superior derecho); o (iii) no bloquearon la unión de IL-22 *in vitro*, pero tenían actividad neutralizante en un ensayo basado en células (cuadrante inferior derecho).

La **Figura 7** muestra la estructura cristalina de IL-22R formando complejo con IL-22. **(A)** Los dominios D1 y D2 de IL-22R aportan restos a la interfaz con el ligando IL-22. **(B)** Y60 en el dominio D1 es un resto de IL-22R importante que contribuye a la interacción con el sitio 1A del ligando IL-22.

La **Figura 8** muestra la inhibición de la señalización mediada por IL-20 a través de IL-22R en un ensayo de proliferación basado en células. Se probaron diversos mAb para IL-22R en cuanto a su capacidad para inhibir la proliferación inducida por IL-20 de células Baf3-hIL-22R/IL20Rb.

La **Figura 9** muestra la inhibición de la señalización mediada por IL-22 e IL-20 a través de IL-22R en ensayos basados en células. **(A)** Se muestra el efecto de los mAb (forma siglada de *monoclonal antibody*, anticuerpo monoclonal) para IL-22R sobre la proliferación de la línea celular BW-hIL-22R. Las células BW-hIL-22R expresan de manera estable el IL-22R humano y el crecimiento se inhibe/detiene en respuesta al ligando IL-22. Los anticuerpos capaces de bloquear la interacción entre IL-22 y hIL-22R alivian la inhibición del crecimiento mediada por la unión ligando-receptor. **(B)** Se muestra el efecto de los mAb para IL-22R sobre la proliferación de la línea celular Baf3-hIL-22R/IL20Rb. Las células Baf3-hIL-22R/IL20Rb expresan de manera estable los componentes del complejo receptor IL-22R/IL20Rb de manera que las células proliferan en presencia de IL-20. Los anticuerpos capaces de bloquear la interacción entre IL-20 y este complejo receptor inhiben la proliferación inducida por la unión del ligando.

La **Figura 10** muestra esquemáticamente los resultados de los experimentos de mapeo epítópico para los anticuerpos para IL-22R con modificaciones de estirpe germinal 230C9 y 223G5. Obsérvese que "Zymo" es equivalente a 280-346-TSY".

5 La **Figura 11** muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal para IL-22R humano y de mono cinomolgo, según lo determinado por análisis FACS. El anticuerpo 230C9 reacciona de forma cruzada con IL-22R humano e IL-22R de cinomolgo (paneles de la izquierda) mientras que el anticuerpo 223G5 se une a IL-22R humano, pero no reacciona de forma cruzada con IL-22R de cinomolgo (paneles de la derecha).

10 15 La **Figura 12** muestra datos farmacocinéticos para el anticuerpo para IL-22R 230C9. Se inyectaron por vía intravenosa monos cinomolglos una única dosis de anticuerpo de 10 mg/kg. Se tomaron muestras en distintos puntos temporales y se analizaron en cuanto a la concentración plasmática de anticuerpos mediante ELISA. Se descubrió que el anticuerpo 230C9 tiene una semivida de aproximadamente 19,4 días.

20 25 La **Figura 13** muestra datos farmacocinéticos para el anticuerpo para IL-22R 230C9 a diversas dosis. A dosis más altas (≥ 10 mg/kg), cuando la capacidad de disposición del fármaco mediada por la diana (TMDD, forma siglada de *target mediated drug disposition*) está saturada, los valores de depuración se acercan a la eliminación no específica por el SRE. B. Depuración de 230C9-N297Q en mono cinomolgo. La depuración total representa la suma de 1) TMDD que es no lineal y saturable y 2) eliminación no específica que es lineal y atribuida al SRE. La semivida plasmática tiene una relación inversa con la depuración, lo que conduce a una semivida prolongada a dosis altas y a una semivida más corta a dosis más bajas debido a la depuración mediada por la diana.

30 35 La **Figura 14** muestra el efecto farmacodinámico del anticuerpo para IL-22R 230C9. Se expuso un mono cinomolgo a 230C9 en distintas dosis y se evaluaron los efectos sobre un corte de piel tratada con IMQ y un corte de piel normal del mono. Se descubrió que dosis crecientes de anticuerpo 230C9 normalizan el grosor epidérmico (A) y reducen la frecuencia de núcleos positivos para Ki67 (B) en el corte de piel tratada con IMQ.

40 45 La **Figura 15** muestra el efecto del anticuerpo para IL-22R 230C9 (ARGX-112) sobre los niveles de ARNm de FLG2 regulados por IL-22 en biopsias cutáneas en sacabocados. A los monos cinomolglos se les administraron infusiones i.v. únicas de anticuerpo 230C9 en distintas dosis: 1 mg/kg, 5 mg/kg y 30 mg/kg (3 animales por dosis). La IL-22 humana recombinante redujo los niveles totales de ARNm de FLG2 en la piel, mientras que el anticuerpo 230C9 invirtió este efecto. El eje de ordenadas indica la expresión relativa de FLG2 en comparación con un gen de referencia. Las comparaciones estadísticas entre grupos se indican mediante las líneas en la parte superior del gráfico con los siguientes intervalos de confianza: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. Los porcentajes mostrados (60 %, 64 %, 60 %, respectivamente) indican el % de inhibición de la señal.

50 55 La **Figura 16** muestra el efecto del anticuerpo para IL-22R 230C9 (ARGX-112) sobre la expresión génica de DEFB4 regulada por IL-22 en explantes de piel humanos *ex vivo*. Los explantes de piel abdominal se trataron con concentraciones crecientes de anticuerpo 230C9 antes de la estimulación con rhIL-22 (forma siglada de *recombinant human IL-22*, IL-22 humana recombinante) 20 ng/ml. El anticuerpo 230C9 pudo invertir el aumento mediado por IL-22 en los niveles de ARNm de DEFB4 de una manera dependiente de la dosis. El eje de ordenadas indica la expresión relativa de DEFB4 en comparación con un gen de referencia. LLOQ significa nivel inferior de cuantificación (*lower level of quantification*).

60 65 La **Figura 17** muestra el efecto del anticuerpo para IL-22R 230C9 (ARGX-112) sobre la expresión génica de FLG2 y LOR regulada por IL-22 en explantes de piel de monos cinomolglos *ex vivo*. Las biopsias de piel se trataron con concentraciones crecientes de anticuerpo 230C9 antes de la estimulación con rhIL-22 20 ng/ml. El anticuerpo 230C9 pudo disminuir el aumento mediado por IL-22 en los niveles de ARNm de FLG2 (A) y de LOR (B) de una manera dependiente de la dosis. Los ejes de ordenadas indican la expresión relativa de FLG2 y LOR en comparación con un gen de referencia.

70 75 La **Figura 18** muestra el efecto del anticuerpo para IL-22R 230C9 (ARGX-112) sobre queratinocitos humanos primarios. Los queratinocitos se pretrataron con anticuerpo 230C9 y luego se estimularon con una mezcla de IL-4, IL-13, IL-22 e IFN- γ . Las células de control se trataron con una mezcla de IL-4, IL-13 e IFN- γ . El anticuerpo 230C9 mostró una inhibición dependiente de la dosis de la secreción de CCL2.

Descripción detallada

A. Definiciones

"Anticuerpo" o "Inmunoglobulina" - Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" incluye un polipéptido que tiene una combinación de dos cadenas pesadas y dos ligera posea o no alguna inmunorreactividad específica de interés. "Anticuerpos" se refiere a tales conjuntos que tienen una actividad inmunorreactiva específica conocida significativa para un antígeno de interés (por ejemplo, el receptor de citocinas

IL-22R). La expresión "anticuerpos para IL-22R" se usa en el presente documento para hacer referencia a anticuerpos que presentan especificidad inmunológica por la proteína IL-22R, incluyendo IL-22R humana y en algunos casos especies homólogas de la misma. Los anticuerpos e inmunoglobulinas comprenden cadenas ligeras y pesadas, con o sin un enlace covalente intercatenario entre ellas. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas de vertebrados están relativamente bien comprendidas.

El término genérico "inmunoglobulina" comprende cinco clases distintas de anticuerpo que pueden distinguirse bioquímicamente. Las cinco clases de anticuerpos están dentro del alcance de la presente invención. El siguiente análisis se referirá, en líneas generales, a la clase IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a la IgG, las inmunoglobulinas comprenden dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas de un peso molecular de aproximadamente 23.000 daltons y dos cadenas pesadas idénticas de un peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas mediante enlaces disulfuro en una configuración en "Y" donde las cadenas ligeras enmarcan a las cadenas pesadas comenzando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras de un anticuerpo se clasifican como kappa o lambda (κ, λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse con una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de la "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan mediante hibridomas, linfocitos B o células hospedadoras modificadas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos discurren desde un extremo N en los extremos bifurcados de la configuración en Y hasta el extremo C en la parte inferior de cada cadena. Los expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, ($\gamma, \mu, \alpha, \delta, \epsilon$) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1-\gamma 4$). La naturaleza de esta cadena es lo que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc. están bien caracterizadas y son conocidas por conferir especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles por los expertos en la materia en vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente invención.

Como se indica anteriormente, la región variable de un anticuerpo permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopos en antígenos. Es decir, el dominio VL y el dominio VH de un anticuerpo se combinan para formar la región variable que define un sitio de unión a antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión a antígeno se define por tres regiones determinantes de complementariedad (las CDR) en cada una de las cadenas VH y VL.

"IL-22R" - Como se usa en el presente documento, el término "IL-22R" significa el receptor de citocinas de tipo II que media la señalización a través de los ligandos IL-22, IL-20 e IL-24. IL-22R es capaz de formar complejos heterodiméricos en la superficie celular con IL-10R2 e IL-20R2. IL-22R también puede denominarse IL22R, IL-22R1, IL22R1, IL22RA, IL-22RA, CRF2-9 y Zcytor 11. El término "IL-22R1" es lo suficientemente amplio como para cubrir la forma humana del receptor y las especies homólogas. La secuencia de aminoácidos de IL-22R humano de longitud completa está representada por la SEQ ID NO: 71 y la secuencia de nucleótidos codificante está representada por la SEQ ID NO: 72 (véanse Figuras 2 y 3). Estas secuencias corresponden a las secuencias depositadas en la base de datos SwissProt como la proteína humana subunidad del receptor de interleucina 22, número de referencia Q8N6P7.

"Sitio de unión" - Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de unión" comprende una región de un polipéptido que es responsable de la unión selectiva a un antígeno diana de interés (por ejemplo, IL-22R). Los dominios de unión comprenden al menos un sitio de unión. Los dominios de unión ilustrativos incluyen un dominio variable de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden comprender un único sitio de unión o múltiples (por ejemplo, dos, tres o cuatro) sitios de unión.

"Obtenido de" - Como se usa en el presente documento, la expresión "obtenido de" una proteína designada (por ejemplo, un anticuerpo de camélido o un fragmento de unión a antígeno del mismo) se refiere al origen de la secuencia polipeptídica o de aminoácidos. En una realización, el polipéptido o secuencia de aminoácidos que se obtiene de un polipéptido de partida particular es una secuencia de CDR o secuencia relacionada con la misma. En una realización, la secuencia de aminoácidos que se obtiene de un polipéptido de partida particular no es contigua. Por ejemplo, en una realización, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDR se obtienen de un anticuerpo de partida. En una realización, el polipéptido o secuencia de aminoácidos que se obtiene de un polipéptido o secuencia de aminoácidos de partida particular tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a la de la secuencia de partida, o una porción de la misma, donde la porción consiste en al menos 3-5 aminoácidos, al menos 5-10 aminoácidos, al menos 10-20 aminoácidos, al menos 20-30 aminoácidos o al menos 30-50 aminoácidos, o que un experto en la materia puede identificar de otro modo como que tiene su origen en la secuencia de partida. En una realización, la una o más secuencias de CDR obtenidas del anticuerpo de partida se alteran para producir secuencias de CDR variantes, por ejemplo, variantes de afinidad, donde las secuencias de CDR variantes mantienen la actividad de unión al antígeno diana.

"Obtenido de camélido" - En determinadas realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención comprenden

- secuencias de aminoácidos del armazón y/o secuencias de aminoácidos de CDR obtenidas de un anticuerpo convencional de camélido generado por inmunización activa de un camélido. Sin embargo, los anticuerpos de la invención que comprenden secuencias de aminoácidos obtenidas de camélido pueden diseñarse técnicamente para comprender secuencias del armazón y/o de regiones constantes obtenidas de una secuencia de aminoácidos humana (es decir, un anticuerpo humano) u otras especies de mamíferos no camélidos. Por ejemplo, pueden incluirse en los anticuerpos para IL-22R objeto una región marco conservada de primate humano o no humano, una porción de cadena pesada y/o una porción de bisagra. En una realización, pueden estar presentes en la región marco conservada de un anticuerpo "obtenido de camélido" uno o más aminoácidos no de camélido, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de armazón de camélido puede comprender una o más mutaciones de aminoácidos 5 en las que está presente el correspondiente resto de aminoácido de primate humano o no humano. Además, pueden 10 unirse a los dominios constantes de anticuerpos humanos dominios VH y VL obtenidos de camélido, o variantes humanizadas de los mismos, para producir una molécula quimérica, como se describe en otra parte del presente documento.
- 15 **"Sustitución conservativa de aminoácido"** - Una "sustitución conservativa de aminoácido" es una en que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, 20 tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un resto de aminoácido no 25 esencial en un polipéptido de inmunoglobulina puede remplazarse por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, una hilera de aminoácidos puede remplazarse por una hilera estructuralmente similar que difiere en el orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadena lateral.
- 30 **"Porción de cadena pesada"** - Como se usa en el presente documento, la expresión "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos obtenidas de los dominios constantes de una cadena pesada de inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una parte de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio de bisagra (por ejemplo, región de bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, 35 un dominio CH3 o una variante o fragmento de los mismos. En una realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención puede comprender la porción Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, una porción de bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3). En otra realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención puede carecer de al menos una porción de un dominio constante (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2). En determinadas realizaciones, al menos uno, y preferentemente la totalidad, de los dominios constantes se obtienen de una cadena pesada de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, en una realización preferida, la porción de cadena pesada comprende un dominio de bisagra completamente humano. En otras realizaciones preferidas, la porción de cadena pesada que comprende una porción Fc completamente humana (por ejemplo, secuencias de dominio de bisagra, CH2 y CH3 de una inmunoglobulina humana).
- 40 En determinadas realizaciones, los dominios constantes constituyentes de la porción de la cadena pesada son de distintas moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio CH2 obtenido de una molécula de IgG1 y una región de bisagra obtenida de una molécula de IgG3 o IgG4. En otras realizaciones, los dominios constantes son dominios químéricos que comprenden 45 porciones de distintas moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una bisagra puede comprender una primera porción de una molécula de IgG1 y una segunda porción de una molécula de IgG3 o IgG4. Como se expone anteriormente, un experto en la materia comprenderá que los dominios constantes de la porción de cadena pesada pueden modificarse de modo que varíen en la secuencia de aminoácidos respecto a la molécula de inmunoglobulina de origen natural (de tipo silvestre). Es decir, los polipéptidos de la invención divulgada en el presente documento 50 pueden comprender alteraciones y modificaciones en uno o más dominios constantes de cadena pesada (CH1, bisagra, CH2 o CH3) y/o en el dominio de la región constante de cadena ligera (CL). Las modificaciones ilustrativas incluyen adiciones, delecciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en uno o más dominios.
- 55 **"Químérico"** - Una proteína "químérica" comprende una primera secuencia de aminoácidos unida a una segunda secuencia de aminoácidos con la que no está unida de forma natural en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se juntan en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína, pero se colocan en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Puede crearse una proteína químérica, por ejemplo, por síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido 60 en el que las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada. Los anticuerpos químéricos ilustrativos de la invención incluyen proteínas de fusión que comprenden dominios VH y VL obtenidos de camélido, o variantes humanizadas de los mismos, fusionadas a los dominios constantes de un anticuerpo humano, por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.
- 65 **"Región variable" o "dominio variable"** - Las expresiones "región variable" y "dominio variable" se usan en el presente documento indistintamente y se pretende que tengan un significado equivalente. El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables VH y VL difieren ampliamente en la

secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno diana. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados "bucles hipervariables" en cada dominio VL y dominio VH que forman parte del sitio de unión a antígeno. Los primero, segundo y tercero bucles hipervariables del dominio de cadena ligera VLambda se denominan en el presente documento L1(λ), L2(λ) y L3(λ) y pueden definirse como comprendiendo los restos 24-33 (L1(λ), que consiste en 9, 10 u 11 restos de aminoácido), 49-53 (L2(λ), que consiste en 3 restos) y 90-96 (L3(λ), que consiste en 5 restos) en el dominio VL (Morea *et al.*, Methods 20:267-279 (2000)). Los primero, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio de cadena ligera Vkappa se denominan en el presente documento L1(κ), L2(κ) y L3(κ) y pueden definirse como comprendiendo los restos 25-33 (L1(κ), que consiste en 6, 7, 8, 11, 12 o 13 restos), 49-53 (L2(κ), que consiste en 3 restos) y 90-97 (L3(κ), que consiste en 6 restos) en el dominio VL (Morea *et al.*, Methods 20:267-279 (2000)). Los primero, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio VH se denominan en el presente documento H1, H2 y H3 y pueden definirse como comprendiendo los restos 25-33 (H1, que consiste en 7, 8 o 9 restos), 52-56 (H2, que consiste en 3 o 4 restos) y 91-105 (H3, muy variable en longitud) en el dominio VH (Morea *et al.*, Methods 20:267-279 (2000)).

5 Salvo que se indique otra cosa, los términos L1, L2 y L3 se refieren respectivamente al primer, segundo y tercer bucles hipervariables de un dominio VL, y abarcan bucles hipervariables obtenidos de ambos isotipos Vkappa y VLambda. Los términos H1, H2 y H3 se refieren respectivamente al primer, segundo y tercer bucles hipervariables del dominio VH, y abarcan bucles hipervariables obtenidos de cualquiera de los isotipos de cadena pesada conocidos, incluyendo γ, ε, δ, α o μ.

10 Los bucles hipervariables L1, L2, L3, H1, H2 y H3 pueden comprender, cada uno, parte de una "región determinante de complementariedad" o "CDR", como se define a continuación. Las expresiones "bucle hipervariable" y "región determinante de complementariedad" no son estrictamente sinónimas, ya que los bucles hipervariables (los HV) se definen basándose en la estructura, mientras que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se definen basándose en la variabilidad de secuencia (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983) y los límites de los HV y las CDR pueden ser distintos en algunos dominios VH y VL.

15 20 25 30 35 40 45 50

Las CDR de los dominios VL y VH pueden definirse normalmente por comprender los siguientes aminoácidos: restos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en el dominio variable de cadena ligera, y restos 31-35 o 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en el dominio variable de cadena pesada; (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Por tanto, los HV pueden estar comprendidos dentro de las CDR correspondientes y las referencias en el presente documento a los "bucles hipervariables" de dominios VH y VL deben interpretarse abarcando también las correspondientes CDR, y viceversa, salvo que se indique otra cosa.

Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco conservadas (FR), como se define a continuación. Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cada uno cuatro FR (FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente), que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, conectadas por los tres bucles hipervariables. Los bucles hipervariables en cada cadena se mantienen juntos en estrecha proximidad por las FR y, con los bucles hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. El análisis estructural de los anticuerpos reveló la relación entre la secuencia y la forma del sitio de unión formado por las regiones determinantes de complementariedad (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992)); Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215:175-182 (1990)). A pesar de su alta variabilidad de secuencia, cinco de los seis bucles adoptan únicamente un pequeño repertorio de conformaciones de cadena principal, denominadas "estructuras canónicas". Estas conformaciones en primera instancia están determinadas por la longitud de los bucles y en segundo lugar por la presencia de restos clave en determinadas posiciones en los bucles y en las regiones marco conservadas que determinan la conformación a través de su compactación, formación de enlaces de hidrógeno o la capacidad de asumir conformaciones de cadena principal inusuales.

"CDR" - Como se usa en el presente documento, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" significa los sitios de combinación con antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Estas regiones particulares se han descrito por Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) y Kabat *et al.*, Sequences of protein of immunological interest. (1991), y por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y por MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) en que las definiciones incluyen solapamientos o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Los restos de aminoácidos que abarcan las CDR como se definen por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen para su comparación. Preferentemente, el término "CDR" es una CDR como se define por Kabat basada en comparaciones de secuencia.

Tabla 1: Definiciones de CDR

	Definiciones de CDR		
	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
CDR1 de V _H	31-35	26-32	30-35
CDR2 de V _H	50-65	53-55	47-58
CDR3 de V _H	95-102	96-101	93-101
CDR1 de V _L	24-34	26-32	30-36
CDR2 de V _L	50-56	50-52	46-55
CDR3 de V _L	89-97	91-96	89-96

¹La numeración de restos sigue la nomenclatura de Kabat *et al.*, citado anteriormente
²La numeración de restos sigue la nomenclatura de Chothia *et al.*, citado anteriormente
³La numeración de restos sigue la nomenclatura de MacCallum *et al.*, citado anteriormente

"Región marco conservada" - La expresión "región marco conservada" o "región FR" como se usa en el presente documento, incluye los restos de aminoácidos que forman parte de la región variable, pero no son parte de las CDR (por ejemplo, utilizando la definición de Kabat de las CDR). Por lo tanto, una región marco conservada variable es de entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud, pero incluye solamente los aminoácidos fuera de las CDR. Para el ejemplo específico de un dominio variable de cadena pesada y para las CDR como se definen por Kabat *et al.*, la región marco conservada 1 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 1-30; la región marco conservada 2 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 36-49; la región marco conservada 3 corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 66-94, y la región marco conservada 4 corresponde al dominio de la región variable desde el aminoácido 103 hasta el final de la región variable. Las regiones marco conservadas para la cadena ligera están separadas de forma similar por cada una de las CDR de la región variable de cadena ligera. De manera similar, utilizando la definición de las CDR de Chothia *et al.* o McCallum *et al.*, los límites de la región marco conservada están separados por los extremos respectivos de las CDR como se describe anteriormente. En realizaciones preferidas, las CDR son como se definen por Kabat.

En los anticuerpos de origen natural, las seis CDR presentes en cada anticuerpo monomérico son secuencias cortas, no contiguas de aminoácidos que se posicionan específicamente para formar el sitio de unión a antígeno cuando el anticuerpo asume su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los dominios variables de pesada y ligera muestra menos variabilidad intermolecular en la secuencia de aminoácidos y se denominan regiones marco conservadas. Las regiones marco conservadas adoptan en gran medida una conformación de lámina β y las CDR forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β. Por tanto, estas regiones marco conservadas actúan formando un armazón que proporciona el posicionamiento de las seis CDR en la orientación correcta mediante interacciones intercatenarias, no covalentes. El sitio de unión a antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítopo en el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria estimula la unión no covalente del anticuerpo al epítopo del antígeno inmunorreactivo. La posición de las CDR puede identificarse fácilmente un experto en la materia.

"Región bisagra" - Como se usa en el presente documento, la expresión "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones de unión a antígeno N-terminales se muevan de forma independiente. Las regiones bisagra se pueden subdividir en tres dominios distintos: dominios de bisagra superior, media e inferior (Roux K.H. *et al.* J. Immunol. 161:4083-90 1998). Los anticuerpos de la invención que comprenden una región bisagra "completamente humana" pueden contener una de las secuencias de la región bisagra que se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias de bisagra humana

IgG	Bisagra superior	Bisagra media	Bisagra inferior
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 82)	CPPCP (SEQ ID NO:83)	APELLGGP (SEQ ID NO:84)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 85)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ (SEQ ID NO:86)	APELLGGP (SEQ ID NO:87)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO:88)	CPSCP (SEQ ID NO:89)	APEFLGGP (SEQ ID NO:90)
IgG42	ERK (SEQ ID NO:91)	CCVECPPPCP (SEQ ID NO:92)	APPVAGP (SEQ ID NO:93)

"Dominio CH2" - Como se usa en el presente documento, la expresión "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el resto 244 al resto 360 de un

- anticuerpo, utilizando los esquemas de numeración convencionales (restos 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y restos 231-340, sistema de numeración de EU, Kabat EA *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH. 1991). El dominio CH2 es único en el sentido de que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas unidas en N se interponen entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 al extremo C-terminal de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 restos.
- 5 **"Fragmento"** - El término "fragmento", como se usa en el contexto de los anticuerpos de la invención, se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende menos restos de aminoácidos que el anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa. La expresión "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compite con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se obtuvo) por la unión al antígeno (es decir, unión específica a IL-22R). Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" de una molécula de anticuerpo incluye fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, por ejemplo, un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo (VL), un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), un anticuerpo monocatenario (scFv), un fragmento F(ab')2, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv y un fragmento de anticuerpo de dominio único (DAb). Los fragmentos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo o cadena de anticuerpo intacta o completa o por medios recombinantes.
- 10 **"Valencia"**- Como se usa en el presente documento, el término "valencia" se refiere al número de posibles sitios de unión a la diana en un polipéptido. Cada sitio de unión a diana se une específicamente a una molécula diana o sitio específico en una molécula diana. Cuando un polipéptido comprende más de un sitio de unión a la diana, cada sitio de unión a diana puede unirse específicamente a la misma molécula o a moléculas distintas (por ejemplo, puede unirse a distintos ligandos o distintos antígenos, o distintos epítopos en el mismo antígeno).
- 15 **"Especificidad"** - el término "especificidad" se refiere a la capacidad de unirse (por ejemplo, inmunorreaccionar con) a una diana dada, por ejemplo, IL-22R. Un polipéptido puede ser monoespecífico y contener uno o más sitios de unión que se unen específicamente a una diana o un polipéptido puede ser multiespecífico y contener dos o más sitios de unión que se unen específicamente a la misma diana o a distintas dianas.
- 20 **"Sintético"** - Como se usa en el presente documento, el término "sintético", con respecto a polipéptidos, incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que no se de origen natural. Por ejemplo, polipéptidos que no son de origen natural que son formas modificadas de polipéptidos de origen natural (por ejemplo, que comprenden una mutación tal como una adición, sustitución o delección) o que comprenden una primera secuencia de aminoácidos (que puede ser de origen natural o no) que está unida en una secuencia lineal de aminoácidos a una segunda secuencia de aminoácidos (que puede ser de origen natural o no) a la que no está unida de forma natural en la naturaleza.
- 25 **"Diseñado técnicamente"** - Como se usa en el presente documento, la expresión "diseñado técnicamente" incluye la manipulación de moléculas de ácido nucleico o polipeptídicas por medios sintéticos (por ejemplo, por técnicas recombinantes, síntesis peptídica *in vitro*, por acoplamiento enzimático o químico de péptidos o alguna combinación de estas técnicas). Preferentemente, los anticuerpos de la invención están diseñados técnicamente, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos humanizados y/o quiméricos, y anticuerpos que han sido diseñados técnicamente para mejorar una o más propiedades, tal como la unión al antígeno, la estabilidad/semivida o la función efectora.
- 30 **"Anticuerpo modificado"** - Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo modificado" incluye formas sintéticas de anticuerpos que se alteran de modo que no sean de origen natural, por ejemplo, anticuerpos que comprenden al menos dos porciones de la cadena pesada, pero no dos cadenas pesadas completas (tales como anticuerpos de dominio deletreado o minicuerpos); formas multiespecíficas de anticuerpos (por ejemplo, biespecíficas, triespecíficas, etc.) alteradas para que se unan a dos o más antígenos distintos o a distintos epítopos en un solo antígeno; moléculas de cadena pesada unidas a moléculas scFv y similares. Las moléculas scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.892.019. Además, la expresión "anticuerpo modificado" incluye formas multivalentes de anticuerpos (por ejemplo, trivalente, tetravalente, etc., anticuerpos que se unen a tres o más copias del mismo antígeno). En otra realización, un anticuerpo modificado de la invención es una proteína de fusión que comprende al menos una porción de la cadena pesada que carece de un dominio CH2 y que comprende un dominio de unión de un polipéptido que comprende la porción de unión de un miembro de una pareja de ligando y receptor.
- 35 La expresión "anticuerpo modificado" también puede usarse en el presente documento para hacer referencia a variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de la invención como se define estructuralmente en el presente documento. Un experto en la materia entenderá que un anticuerpo puede modificarse para que produzca un anticuerpo variante que varía en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo del que se obtuvo. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de nucleótidos o aminoácidos que dan lugar a sustituciones o cambios conservativos en restos de aminoácidos "no esenciales" (por ejemplo, en restos de CDR y/o de armazón). Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el reemplazo de uno o más aminoácidos por un aminoácido de

origen natural o no natural.

"Sustituciones de humanización" - Como se usa en el presente documento, la expresión "sustituciones de humanización" se refiere a sustituciones de aminoácidos en las que el resto de aminoácido presente en una posición

5 particular en el dominio VH o VL de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo para IL-22R obtenido de camélido) se reemplaza por un resto de aminoácido que se produce en una posición equivalente en un dominio VH o VL humano de referencia. El dominio VH o VL humano de referencia puede ser un dominio VH o VL codificado por la estirpe germinal humana. Pueden realizarse sustituciones de humanización en las regiones marco conservadas y/o las CDR de los anticuerpos, definidas en el presente documento.

10 **"Variantes humanizadas "** - Como se usa en el presente documento, la expresión "variante humanizada" se refiere a un anticuerpo variante que contiene una o más "sustituciones de humanización" en comparación con un anticuerpo de referencia, donde una porción del anticuerpo de referencia (por ejemplo, el dominio VH y/o el dominio VL o partes del mismo que contienen al menos una CDR) tiene un aminoácido obtenido de una especie no humana, y las

15 "sustituciones de humanización" se producen dentro de la secuencia de aminoácidos obtenida de una especie no humana.

"Variantes con modificaciones de estirpe germinal" - La expresión "variante con modificaciones de estirpe germinal" se usa en el presente documento para referirse específicamente a "variantes humanizadas" en las que las

20 "sustituciones de humanización" dan como resultado el reemplazo de uno o más restos de aminoácidos presentes en una posición (o posiciones) particular en el dominio VH o VL de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo para IL-22R obtenido de camélido) por un resto de aminoácido que se encuentra en una posición equivalente en un dominio VH o VL humano de referencia codificado por la estirpe germinal humana. Es típico que para cualquier

25 "variante con modificaciones de estirpe germinal", los restos de aminoácidos de reemplazo sustituidos *en la variante con modificaciones de estirpe germinal* se toman exclusiva, o predominantemente, de un único dominio VH o VL codificado por la estirpe germinal humana. Las expresiones "variante humanizada" y "variante con modificaciones de estirpe germinal" se usan a menudo indistintamente en el presente documento. La introducción de una o más

30 "sustituciones de humanización" en un dominio VH o VL obtenido de camélido (por ejemplo, obtenido de llama) da como resultado la producción de una "variante humanizada" del dominio VH o VL obtenido de camélido (llama). Si los restos de aminoácidos sustituidos se obtienen predominante o exclusivamente de una única secuencia de dominio VH o VL codificada por la estirpe germinal humana, entonces el resultado puede ser una "variante con modificaciones de estirpe germinal humana" del dominio VH o VL obtenido de camélidos (llama).

"Variantes de afinidad" - Como se usa en el presente documento, la expresión "variante de afinidad" se refiere a un

35 anticuerpo variante que presenta uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos en comparación con un anticuerpo de referencia, donde la variante de afinidad presenta una afinidad alterada por el antígeno diana comparación con el anticuerpo de referencia. Por ejemplo, las variantes de afinidad presentarán una afinidad cambiada por IL-22R, en comparación con el anticuerpo para IL-22R de referencia. Preferentemente, la variante de

40 afinidad presentará una afinidad *mejorada* por el antígeno diana, por ejemplo, IL-22R, en comparación con el anticuerpo de referencia. Las variantes de afinidad normalmente presentan uno o más cambios en la secuencia de aminoácidos en las CDR, en comparación con el anticuerpo de referencia. Dichas sustituciones pueden dar como resultado el reemplazo del aminoácido original presente en una posición dada en las CDR por un resto de aminoácido distinto, que puede ser un resto de aminoácido de origen natural o un resto de aminoácido que no es de

45 origen natural. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservativas o no conservativas.

50 **"Alta homología humana"** - Se considerará que un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) tiene una alta homología humana si los dominios VH y los dominios VL, en conjunto, presentan al menos el 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias VH y VL de la estirpe germinal humana coincidentes más cercanas. Los anticuerpos que tienen una alta homología humana pueden incluir anticuerpos que comprenden dominios VH y VL de anticuerpos nativos no humanos que presentan un % de identidad de secuencia suficientemente alto con las secuencias de estirpe germinal humana, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos que comprenden dominios VH y VL de anticuerpos convencionales de camélido, así como variantes de diseñadas técnicamente, especialmente humanizadas o con modificaciones de estirpe germinal, de tales anticuerpos y también anticuerpos "totalmente humanos".

55 En una realización, el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana puede presentar una identidad de secuencia o una homología de secuencia de aminoácidos del 80 % o más con uno o más dominios VH humanos a lo largo de las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 e FR4. En otras realizaciones, la identidad de secuencia o la homología de secuencia de aminoácidos entre el dominio VH del polipéptido de la invención y la secuencia del dominio VH de la estirpe germinal humana coincidente más cercana puede ser del 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 97 % o más, o hasta del 99 % o incluso del 100 %.

60 En una realización, el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana puede contener una o más (por ejemplo, 1 a 10) falta de coincidencias de secuencias de aminoácidos en las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, en comparación con la secuencia de VH humano coincidente más cercana.

En otra realización, el dominio VL del anticuerpo con alta homología humana puede presentar una identidad de secuencia o una homología de secuencia del 80 % o más con uno o más dominios VL humanos a lo largo de las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 e FR4. En otras realizaciones, la identidad de secuencia o la homología de secuencia de aminoácidos entre el dominio VL del polipéptido de la invención y la secuencia del dominio VL de la estirpe germinal humana coincidente más cercana puede ser del 85 % o más, del 90 % o más, el 95 % o más, el 97 % o más, o hasta del 99 % o incluso del 100 %.

5 En una realización, el dominio VL del anticuerpo con alta homología humana puede contener una o más (por ejemplo, 1 a 10) falta de coincidencias de secuencias de aminoácidos en las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, en comparación con la secuencia de VL humano coincidente más cercana.

10 Antes de analizar el porcentaje de identidad de secuencia entre el anticuerpo con alta homología humana y los VH y VL de estirpe germinal humana, pueden determinarse los pliegues canónicos, lo que permite la identificación de la familia de segmentos de estirpe germinal humana con la combinación idéntica de pliegues canónicos para H1 y H2 o L1 y L2 (y L3). Posteriormente, el miembro de la familia de la estirpe germinal humana que tiene el mayor grado de 15 homología de secuencia con la región variable del anticuerpo de interés se elige para puntuar la homología de secuencia. La determinación de las clases canónicas de Chothia de bucles hipervariables L1, L2, L3, H1 y H2 se puede realizar con las herramientas de bioinformática disponibles públicamente en la página de internet www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html.page. El resultado del programa muestra los requisitos de los restos clave en un 20 archivo de datos. En estos archivos de datos, las posiciones de restos clave se muestran con los aminoácidos permitidos en cada posición. La secuencia de la región variable del anticuerpo de interés se proporciona como entrada y en primer lugar se alinea con una secuencia de anticuerpo consenso para asignar el esquema de numeración de Kabat. El análisis de los pliegues canónicos utiliza un conjunto de plantillas de restos clave obtenidas mediante un método automatizado desarrollado por Martin y Thornton (Martin *et al.*, J. Mol. Biol. 263:800-815 25 (1996)).

25 Con el segmento V de estirpe germinal humana particular conocido, que usa la misma combinación de pliegues canónicos para H1 y H2 o L1 y L2 (y L3), se puede determinar el miembro de la familia que coincide mejor en términos de homología de secuencia. Con herramientas bioinformáticas, se puede determinar el porcentaje de 30 identidad de secuencia entre las secuencias de aminoácidos de armazón de los dominios VH y VL del anticuerpo de interés y las secuencias correspondientes codificadas por la estirpe germinal humana, pero en realidad también se puede aplicar la alineación manual de las secuencias. Las secuencias de inmunoglobulinas humanas se pueden 35 identificar a partir de varias bases de datos de proteínas, tales como VBase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) o la base de datos Pluckthun/Honegger (<http://www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines>). Para comparar las secuencias humanas con las regiones V de los dominios VH o VL en un anticuerpo de interés, se puede utilizar un 40 algoritmo de alineamiento de secuencias tal como el disponible en sitios web como www.expasy.ch/tools/#align, pero también se puede realizar un alineamiento manual con el conjunto limitado de secuencias. Las secuencias de las cadenas ligera y pesada de la estirpe germinal humana de las familias con las mismas combinaciones de pliegues canónicos y con el mayor grado de homología con las regiones marco conservadas 1, 2 y 3 de cada cadena se seleccionan y comparan con la región variable de interés; también el FR4 se comprueba con las regiones JH y JK o JL de estirpe germinal humana.

45 Cabe destacar que, en el cálculo del porcentaje total de homología de secuencia, los restos de FR1, FR2 y FR3 se evalúan utilizando la secuencia de coincidencia más cercana de la familia de estirpe germinal humana con la combinación idéntica de pliegues canónicos. Solo se puntuán los restos distintos de la coincidencia más cercana u otros miembros de la misma familia con la misma combinación de pliegues canónicos (obsérvese, excluyendo cualquier diferencia codificada por el cebador). Sin embargo, a los efectos de la humanización, los restos en 50 regiones marco conservadas idénticas a los miembros de otras familias de estirpe germinal humana, que no tienen la misma combinación de pliegues canónicos, pueden considerarse "humanos", a pesar de que estos se puntuán como "negativos" de acuerdo con las rigurosas condiciones descritas anteriormente. Esta suposición se basa en el enfoque de "mezclar y hacer coincidir" para la humanización, en el que cada uno de FR1, FR2, FR3 y FR4 se comparan por separado con su secuencia de estirpe germinal humana coincidente más cercana y, por lo tanto, la molécula humanizada contiene una combinación de distintos FR, como lo hicieron Qu y colegas (Qu *et al.*, Clin. Cancer Res. 5:3095-3100 (1999)) y Ono y colegas (Ono *et al.*, Mol. Immunol. 36:387-395 (1999)). Los límites de las 55 regiones marco conservadas individuales pueden asignarse utilizando el esquema de numeración IMGT, que es una adaptación del esquema de numeración de Chothia (Lefranc *et al.*, NAR 27: 209-212 (1999); imgt.cines.fr).

60 Los anticuerpos con alta homología humana pueden comprender bucles hipervariables o CDR que tienen pliegues canónicos humanos o similares a los humanos, como se explica en detalle a continuación.

65 En una realización, al menos un bucle hipervariable o CDR en el dominio VH o en el dominio VL del anticuerpo con alta homología humana puede obtenerse o proceder de un dominio VH o VL de un anticuerpo no humano, por ejemplo, un anticuerpo convencional de una especie de *Camelidae*, y sin embargo presentar una estructura de pliegue canónica predicha o real que sea sustancialmente idéntica a una estructura de pliegue canónica que se produce en los anticuerpos humanos.

Está bien establecido en la técnica que, aunque las secuencias de aminoácidos primarias de los bucles hipervariables presentes tanto en los dominios VH como en los dominios VL codificados por la estirpe germinal humana son, por definición, altamente variables, todos los bucles hipervariables, excepto H3 de CDR del dominio VH, adoptan solo unas pocas conformaciones estructurales distintas, denominadas pliegues canónicos (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Tramontano *et al.* Proteins 6:382-94 (1989)), que dependen tanto de la longitud del bucle hipervariable como de la presencia de los denominados restos de aminoácidos canónicos (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

- Las estructuras canónicas reales de los bucles hipervariables en los dominios VH o VL intactos se pueden determinar mediante análisis estructural (por ejemplo, cristalografía de rayos X), pero también es posible predecir la estructura canónica sobre la base de los restos de aminoácidos clave que son característicos de una estructura particular (analizado más adelante). En esencia, el patrón específico de restos que determina cada estructura canónica forma una "firma" que permite reconocer la estructura canónica en bucles hipervariables de un dominio VH o VL de estructura desconocida; por tanto, las estructuras canónicas pueden predecirse basándose únicamente en la secuencia de aminoácidos primaria.
- Las estructuras de pliegue canónico predichas para los bucles hipervariables de cualquier secuencia VH o VL dada en un anticuerpo con alta homología humana pueden analizarse utilizando algoritmos que están disponibles públicamente en www.bioinf.org.uk/abs/chothia.html, www.biochem.ucl.ac.uk/martin/antibodies.html y www.bioc.unizh.ch/antibody/Sequences/Germlines/Vbase_hV.html. Estas herramientas permiten que las secuencias de consulta de VH o VL se alineen con secuencias del dominio VH o VL humanas de estructura canónica conocida, y se haga una predicción de la estructura canónica para los bucles hipervariables de la secuencia de consulta.

En el caso del dominio VH, Los bucles H1 y H2 pueden puntuarse como teniendo una estructura de pliegue canónica "sustancialmente idéntica" a una estructura de pliegue canónica que se sabe que se produce en anticuerpos humanos si se cumple al menos el primero, y preferentemente ambos, de los siguientes criterios:

1. Una longitud idéntica, determinada por el número de restos, a la clase estructural canónica humana coincidente más cercana.
2. Al menos el 33 % de identidad, preferentemente al menos el 50 % de identidad con los restos de aminoácidos clave descritos para las clases estructurales canónicas humanas H1 y H2 correspondientes.

(cabe señalar que, para los fines del análisis anterior, los bucles H1 y H2 se tratan por separado y cada uno se compara con su clase estructural canónica humana coincidente más cercana)

El análisis anterior se basa en la predicción de la estructura canónica de los bucles H1 y H2 del anticuerpo de interés. Si se conocen las estructuras reales de los bucles H1 y H2 en el anticuerpo de interés, por ejemplo, basándose en cristalografía de rayos X, entonces los bucles H1 y H2 en el anticuerpo de interés también pueden puntuarse como si tuvieran una estructura de pliegue canónica "sustancialmente idéntica" a una estructura de pliegue canónica que se sabe que se produce en anticuerpos humanos si la longitud del bucle difiere de la clase estructural canónica humana coincidente más cercana (normalmente en ± 1 o ± 2 aminoácidos) pero la estructura real de los bucles H1 y H2 en el anticuerpo de interés coincide con la estructura de un pliegue canónico humano.

Los restos de aminoácidos clave encontrados en las clases estructurales canónicas humanas para el primer y segundo bucles hipervariables de los dominios VH humanos (H1 y H2) se describen en Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 227:799-817 (1992). En particular, la Tabla 3 en la página 802 de Chothia *et al.*, enumera los restos de aminoácidos preferidos en sitios clave para las estructuras canónicas de H1 que se encuentran en la estirpe germinal humana, mientras que la Tabla 4 en la página 803, enumera los restos de aminoácidos preferidos en sitios clave para las estructuras canónicas de H2 de CDR que se encuentran en la estirpe germinal humana.

En una realización, tanto H1 como H2 en el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana presentan una estructura de pliegue canónica real o predicha que es sustancialmente idéntica a una estructura de pliegue canónica que se produce en anticuerpos humanos.

Los anticuerpos con alta homología humana pueden comprender un dominio VH en el que los bucles hipervariables H1 y H2 forman una combinación de estructuras de pliegues canónicas que es idéntica a una combinación de estructuras canónicas que se sabe que se producen en al menos un dominio VH de estirpe germinal humana. Se ha observado que solo determinadas combinaciones de estructuras de pliegues canónicas en H1 y H2 se producen realmente en los dominios VH codificados por la estirpe germinal humana. En una realización, H1 y H2 en el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana pueden obtenerse de un dominio VH de una especie no humana, por ejemplo, una especie de Camelidae, sin embargo, forman una combinación de estructuras de pliegues canónicas predichas o reales que es idéntica a una combinación de estructuras de pliegues canónicas que se sabe que se producen en una estirpe germinal humana o en un dominio VH mutado somáticamente. En realizaciones no limitantes, H1 y H2 en el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana pueden obtenerse de un dominio VH de una especie no humana, por ejemplo, una especie de Camelidae, y forman una de las siguientes combinaciones de pliegues canónicos: 1-1, 1-2, 1-3, 1-6, 1-4, 2-1, 3-1 y 3-5.

Un anticuerpo con alta homología humana puede contener un dominio VH que presenta una alta identidad de secuencia/homología de secuencia con VH humano, y que contiene bucles hipervariables que presentan homología estructural con VH humano.

- 5 Puede ser ventajoso que los pliegues canónicos presentes en H1 y H2 en el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana, y la combinación de los mismos, sean "correctos" para la secuencia de la estirpe germinal de VH humano que representa la coincidencia más cercana con el dominio VH del anticuerpo con alta homología humana en términos de identidad de secuencia de aminoácidos primaria total. A modo de ejemplo, si la secuencia más cercana coincide con un dominio VH3 de la estirpe germinal humana, entonces puede ser ventajoso que H1 y H2 formen una combinación de pliegues canónicos que también se produzcan naturalmente en un dominio VH3 humano. Esto puede ser particularmente importante en el caso de anticuerpos con alta homología humana que se obtienen de especies no humanas, por ejemplo, anticuerpos que contienen dominios VH y VL que se obtienen de anticuerpos convencionales de camélido, especialmente anticuerpos que contienen dominios VH y VL de camélido humanizados.
- 10 15 Por tanto, en una realización, el dominio VH de un anticuerpo para IL-22R con alta homología humana puede presentar una identidad de secuencia o una homología de secuencia del 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 97 % o más, o hasta el 99 % o incluso el 100 % con un dominio VH humano en las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, y además H1 y H2 en el mismo anticuerpo se obtienen de un dominio VH no humano (por ejemplo, procedentes de una especie de *Camelidae*), pero forman una combinación de estructuras de pliegues canónicos predichas o reales que es la misma que una combinación de pliegues canónicos que se sabe que se produce naturalmente en el mismo dominio VH humano.
- 20 25 En otras realizaciones, L1 y L2 en el dominio VL del anticuerpo con alta homología humana se obtienen cada uno de un dominio VL de una especie no humana (por ejemplo, un dominio VL obtenido de camélido), y cada uno presenta una estructura de pliegue canónica predicha o real que es sustancialmente idéntica a una estructura de pliegue canónico que se produce en los anticuerpos humanos.
- 30 35 Al igual que con los dominios VH, los bucles hipervariables de los dominios VL de los tipos VLambda y VKappa pueden adoptar un número limitado de conformaciones o estructuras canónicas, determinadas en parte por la longitud y también por la presencia de restos de aminoácidos clave en determinadas posiciones canónicas. Dentro de un anticuerpo de interés que tiene una alta homología humana, los bucles L1, L2 y L3 obtenidos de un dominio VL de una especie no humana, por ejemplo, una especie de *Camelidae*, pueden puntuarse como teniendo una estructura de pliegue canónica "sustancialmente idéntica" a una estructura de pliegue canónica que se sabe que se produce en anticuerpos humanos si se cumple al menos el primero, y es preferible que ambos, de los siguientes criterios:
- 40 45 1. Una longitud idéntica, determinada por el número de restos, a la clase estructural humana coincidente más cercana.
2. Al menos el 33 % de identidad, preferentemente al menos el 50 % de identidad con los restos de aminoácidos clave descritos para las clases estructurales canónicas humanas L1 o L2 correspondientes, del repertorio de VLambda o VKappa.
(cabe señalar que, para los fines del análisis anterior, los bucles L1 y L2 se tratan por separado y cada uno se compara con su clase estructural canónica humana coincidente más cercana)
- 50 55 El análisis anterior se basa en la predicción de la estructura canónica de los bucles L1, L2 y L3 en el dominio VL del anticuerpo de interés. Si se conoce la estructura real de los bucles L1, L2 y L3, por ejemplo, basándose en cristalografía de rayos X, entonces los bucles L1, L2 y L3 obtenidos del anticuerpo de interés también pueden puntuarse como si tuvieran una estructura de pliegue canónica "sustancialmente idéntica" a una estructura de pliegue canónica que se sabe que se produce en anticuerpos humanos si la longitud del bucle difiere de la clase estructural canónica humana coincidente más cercana (normalmente en ±1 o ±2 aminoácidos) pero la estructura real de los bucles de *Camelidae* coincide con un pliegue canónico humano.
- 60 65 Los restos de aminoácidos clave encontrados en las clases estructurales canónicas humanas para las CDR de los dominios VLambda y VKappa humanos se describen en Morea *et al.* Methods, 20: 267-279 (2000) y Martin *et al.*, J. Mol. Biol., 263:800-815 (1996). El repertorio estructural del dominio VKappa humano también se describe en Tomlinson *et al.* EMBO J. 14:4628-4638 (1995), y el del dominio VLambda en Williams *et al.* J. Mol. Biol., 264:220-232 (1996). L1 y L2 en el dominio VL de un anticuerpo con alta homología humana pueden formar una combinación de estructuras de pliegue canónicas predichas o reales, que es idéntica a una combinación de estructuras de pliegue canónica que se sabe que se produce en un dominio VL de la estirpe germinal humana. En realizaciones no limitantes, L1 y L2 en el dominio VLambda de un anticuerpo con alta homología humana (por ejemplo, un anticuerpo que contiene un dominio VL obtenido de camélido o una variante humanizada del mismo) puede formar una de las

siguientes combinaciones de pliegues canónicos: 11-7, 13-7(A,B,C), 14-7(A,B), 12-11, 14-11 y 12-12 (como se define en Williams *et al.* J. Mol. Biol. 264:220 -32 (1996) y como se muestra en http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVL.html). En realizaciones no limitantes, L1 y L2 en el dominio Vkappa pueden formar una de las siguientes combinaciones de pliegues canónicos: 2-1, 3-1, 4-1 y 6-1 (como se define en Tomlinson *et al.* EMBO J. 14:4628-38 (1995) y como se muestra en http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Sequences/Germlines/VBase_hVK.html).

En una realización adicional, los tres de L1, L2 y L3 en el dominio VL de un anticuerpo con alta homología humana pueden presentar una estructura sustancialmente humana. Se prefiere que el dominio VL del anticuerpo con alta homología humana presente una alta identidad de secuencia/homología de secuencia con VL humana y también que los bucles hipervariables en el dominio VL presenten homología estructural con VL humana.

En una realización, el dominio VL de un anticuerpo para IL-22R con alta homología humana puede presentar una identidad de secuencia del 80 % o más, el 85 % o más, el 90 % o más, el 95 % o más, el 97 % o más, o hasta el 99 % o incluso el 100 % con un dominio VL humano en las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 y FR4, y además el bucle hipervariable L1 y el bucle hipervariable L2 pueden formar una combinación de estructuras de pliegues canónicos predichas o reales que es lo mismo que una combinación de pliegues canónicos que se sabe que se produce naturalmente en el mismo dominio VL humano.

Por supuesto, está previsto que los dominios VH que presentan alta identidad de secuencia/homología de secuencia con VH humano, y también homología estructural con bucles hipervariables de VH humano se combinarán con dominios VL que presenten alta identidad de secuencia/homología de secuencia con VL humano, y también homología estructural con bucles hipervariables de VL humano para proporcionar anticuerpos con alta homología humana que contengan emparejamientos VH/VL (por ejemplo, emparejamientos VH/VL obtenidos de camélido) con una máxima homología de secuencia y estructural con emparejamientos VH/VL codificados por humanos.

"scFv" o "fragmento scFv" - Un scFv o fragmento scFv significa un fragmento variable monocatenario. Un scFv es una proteína de fusión de un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo conectados a través de un enlazador.

B. Anticuerpos para IL-22R

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-22R humano. Los anticuerpos para IL-22R y los fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento poseen propiedades, en particular combinaciones de propiedades distintas, que son distintas y en determinados casos superiores, a las de los anticuerpos para IL-22R de la técnica anterior. Estas propiedades y características se describirán ahora con más detalle.

Epítopos de IL-22R

Los anticuerpos para IL-22R y los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen a un epítopo dentro de la proteína IL-22R humana que no incluye el resto de aminoácido tirosina 60 (Tyr60 o Y60), donde esta posición de aminoácido se define con referencia a la secuencia de IL-22R mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 71). Este resto de IL-22R expuesto en superficie se ha identificado previamente como crucial para la unión del ligando, y como se informa en el presente documento (véase, en particular, el Ejemplo 8), el anticuerpo para IL-22R de la técnica anterior 280.346.TSY (como se describe en el documento WO2011/061119) se une a un epítopo que incluye este resto. Los anticuerpos para IL-22R y los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen sorprendentemente a un epítopo que no incluye este resto crucial y, sin embargo, en determinadas realizaciones, son capaces de bloquear la unión de IL-22 y/o de inhibir la señalización mediada por IL-22 y/o IL-20 a través de IL-22R.

La interfaz de unión entre el dominio extracelular de IL-22R y su ligando IL-22 se caracteriza en Jones *et al.* (Structure 16(9): 1333-1344 (2008)). El dominio extracelular de IL-22R consiste en cinco bucles (L2-L6), determinados restos de los cuales son cruciales para mediar interacciones con restos expuestos en la superficie del ligando de IL-22. La tirosina 60 se ubica dentro del bucle L2 formado por restos en el dominio D1 de la proteína IL-22R. En el complejo IL-22/IL-22R soluble, el resto Tyr60 se inserta en una pequeña cavidad en IL-22 creada dentro del sitio 1a del ligando. Más específicamente, esta cavidad se crea en la intersección de la hélice F y el bucle AB, dos estructuras secundarias distintas que se encuentran en el ligando IL-22. Los restos de la hélice F Lys162 y Glu166 en el ligando forman enlaces de hidrógeno al OH de la Tyr60 de IL-22R y, por tanto, la Tyr60 es un resto clave que media la interacción entre el sitio 1a del ligando y el dominio D1 del receptor.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento se unen a un epítopo que no incluye a la Tyr60. Como se señaló anteriormente, la Tyr60 se ubica dentro del bucle L2 en el dominio D1 del receptor. En determinadas realizaciones, el epítopo al que se unen los anticuerpos para IL-22R o los fragmentos de unión a antígeno se ubica al menos en parte en el dominio D2 de IL-22R, es decir, entre los restos 125 y 228 de la SEQ ID NO: 71. En determinadas realizaciones, el epítopo al que se unen los anticuerpos para IL-22R o los fragmentos de unión al antígeno comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres restos de aminoácidos

ubicados dentro del dominio D2 de la proteína IL-22R.

Los inventores creen que el hecho de que los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unan a un epítopo que no incluye la Tyr60 es importante para su modo de acción. Se cree que los

5 anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos interactúan con el dominio D2 de IL22R, en lugar de o además de interactuar con el dominio D1. Se sabe que el dominio D2 de IL-22R está implicado en la interacción con el coreceptor. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los inventores creen que las moléculas de anticuerpo de la

10 presente invención pueden tener un modo de acción doble, previniendo la unión al ligando y previniendo la interacción con el coreceptor.

10 El epítopo al que se unen los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de la invención puede ser un epítopo lineal (es decir, un epítopo que consiste en una secuencia lineal de aminoácidos dentro del antígeno diana) o un epítopo conformacional (es decir, un epítopo que consiste en aminoácidos que son no necesariamente contiguo en el antígeno diana).

15 **Afinidad de unión**

En determinadas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la invención se unen a IL-22R humano con alta afinidad.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "afinidad" o "afinidad de unión" debe entenderse basándose en el significado habitual en la técnica en el contexto de unión del anticuerpo, y refleja la fuerza y/o la estabilidad de la unión entre un antígeno y un sitio de unión en un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

25 La afinidad de unión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por su antígeno respectivo puede determinarse experimentalmente utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los instrumentos de BIACORE miden la afinidad basándose en la inmovilización de una proteína o antígeno diana en un chip biosensor mientras el anticuerpo o fragmento de anticuerpo pasa sobre la diana inmovilizada en condiciones de flujo específicas. Estos experimentos producen mediciones de la k_{on} y la k_{off} , que se puede traducir en valores de K_D ,

30 donde K_D es la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo o fragmento del mismo. Cuanto menor es el valor de K_D , más fuerte será la interacción de unión entre un anticuerpo y su antígeno diana. Como se señaló anteriormente, la afinidad de un anticuerpo puede determinarse mediante Biacore, por ejemplo, utilizando el protocolo descrito en otra parte en el presente documento (véase el Ejemplo 6). La afinidad del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno por e IL-22R humano, medida mediante Biacore, puede

35 determinarse utilizando una construcción de IL-22R recombinante de longitud completa, como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos 3 y 6.

40 Los anticuerpos para IL-22R o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden presentar una constante de disociación (k_{off}) para IL-22R de menos de $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, de menos de $1,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, de menos de $1,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, cuando se prueban como mAb, por ejemplo, cuando se prueba la afinidad de un dominio variable de cadena pesada emparejado con un dominio variable de cadena ligera en el contexto de una molécula de IgG1. En realizaciones preferidas, los anticuerpos para IL-22R o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención presentan una constante de disociación (k_{off}) para IL-22R de menos de $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, preferentemente, de menos de $1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, más preferentemente, de menos de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, cuando se prueban como mAb, por ejemplo, cuando se prueba la afinidad de un dominio variable de cadena pesada emparejado con un dominio variable de cadena ligera en el contexto de una molécula de IgG1.

45 Los anticuerpos para IL-22R o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden presentar una constante de disociación (k_{off}) para IL-22R en el intervalo de $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ a $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, preferentemente en el intervalo de $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ a $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, más preferentemente en el intervalo de $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

50 Los anticuerpos para IL-22R o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden presentar un valor de K_D de menos de $3 \times 10^{-9} \text{ M}$, de menos de $2,5 \times 10^{-9} \text{ M}$, de menos de $1 \times 10^{-9} \text{ M}$. En realizaciones preferidas, los anticuerpos para IL-22R o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención presentan un valor de K_D de menos de $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, preferentemente, de menos de $2 \times 10^{-10} \text{ M}$, preferentemente, de menos de $1,5 \times 10^{-10} \text{ M}$.

Inhibición de la unión de IL-22 e IL-20 y señalización aguas abajo

55 60 En determinadas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la invención se unen a IL-22R humano e inhiben la unión del ligando a este receptor. Esto es particularmente sorprendente dado que los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a un epítopo que no incluye la Tyr60. Como se ha descrito anteriormente, la Tyr60 se ha identificado como un resto crucial para la unión del ligando y, por lo tanto, los anticuerpos para IL-22R y los fragmentos de unión al antígeno de la presente invención son sorprendentes por su capacidad para inhibir la unión del ligando y, en determinadas realizaciones, inhiben la señalización aguas abajo de IL-22R.

Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno pueden unirse a IL-22R humano e inhibir la unión de IL-22 o inhibir la unión de IL-20. Preferentemente, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento inhiben la unión de IL-22 e IL-20 al IL-22R.

5 La unión del ligando a IL-22R en células que expresan el coreceptor IL-10R2 o IL-20R2 induce un cambio conformacional en el complejo receptor de manera que se activan las rutas de señalización aguas abajo del receptor. Los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos como se describe en el presente documento pueden inhibir la activación de IL-22R dependiente de IL-22 o pueden inhibir la activación de IL-22R dependiente de IL-20. Como se usa en el presente documento, la expresión "activación de IL-22R dependiente de IL-22" debe entenderse como la cadena de sucesos de señalización que se producen aguas abajo del complejo receptor IL-22R tras la unión del ligando IL-22 al complejo IL-22R/IL-10R2. Como se usa en el presente documento, la expresión "activación de IL-22R dependiente de IL-20" debe entenderse como la cadena de sucesos de señalización que se producen aguas abajo del complejo receptor IL-22R tras la unión del ligando IL-20 al complejo IL-22R/IL-20R2.

10 La activación de IL-22R dependiente de IL-22 puede medirse en células o líneas celulares que expresan tanto IL-22R como el coreceptor IL-10R2, por ejemplo, la línea celular BW-hIL-22R descrita en Dumoutier *et al.* J Biol Chem. 25 de septiembre de 2009; 284(39): 26377-84. IL-22 induce la detención del crecimiento en la línea celular BW-hIL-22R y, por lo tanto, la activación de IL-22R dependiente de IL-22 puede determinarse en esta línea celular midiendo la proliferación de células BW-hIL-22R, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 6. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento presentan un Cl_{50} (concentración a la que se logra el 50 % de inhibición de la activación) en un ensayo de proliferación basado en células dependiente de IL-22 de menos de 650 pM, preferentemente de menos de 600 pM. El ensayo de proliferación basado en células es preferentemente un ensayo que implica a la línea celular BW-hIL-22R como se describe en el presente documento.

15 La activación de IL-22R dependiente de IL-20 puede medirse en células o líneas celulares que expresan tanto IL-22R como el coreceptor IL-20R2, por ejemplo, la línea celular Baf3-hIL-22R/IL20Rb descrita en el presente documento y también en Dumoutier *et al.* J Biol Chem. 25 de septiembre de 2009; 284(39): 26377-84. IL-20 induce la proliferación en la línea celular Baf3-hIL-22R/IL20Rb y, por lo tanto, la activación de IL-22R dependiente de IL-20 puede determinarse en esta línea celular midiendo la proliferación de células Baf3-hIL-22R/IL20Rb, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 6. En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento presentan un Cl_{50} (concentración a la que se logra el 50 % de inhibición de la activación) en un ensayo de proliferación basado en células dependiente de IL-20 de menos de 1 nM, preferentemente de menos de 800 pM. El ensayo de proliferación basado en células es preferentemente un ensayo que implica a la línea celular Baf3-hIL-22R/IL20Rb como se describe en el presente documento.

20 Además de los ensayos de proliferación descritos anteriormente, la activación de IL-22R dependiente de IL-22 y/o IL-20 puede medirse utilizando ensayos celulares alternativos, por ejemplo, un ensayo de fosforilación de STAT3 como se describe en el documento WO2011/061119.

25 Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen a IL-22R humano e inhiben la activación de IL-22R dependiente de IL-22 y la activación de IL-22R dependiente de IL-20. La actividad inhibidora o "neutralizante" de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno son equipotentes para la activación dependiente de IL-22 e IL-20. En otros ejemplos descritos en el presente documento, la actividad inhibidora o neutralizante de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno puede ser mayor para la activación de IL-22R mediada por uno de los ligandos en comparación con la activación de IL-22R mediada por el otro ligando. En determinados ejemplos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención presentarán una actividad inhibidora más potente para la activación de IL-22R dependiente de IL-22 en comparación con la activación de IL-22R dependiente de IL-20. Sin embargo, en tales ejemplos, la actividad inhibidora del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno para la activación de IL-22R dependiente de IL-22 será normalmente menos de 5 veces, preferentemente menos de 4 veces mayor, más preferentemente menos de 2 veces mayor que la actividad inhibidora del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para la activación de IL-22R dependiente de IL-20.

Reactividad cruzada

30 En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento que se unen a IL-22R humano pueden reaccionar de forma cruzada con una o más especies homólogas de IL-22R, por ejemplo, homólogos de IL-22R de origen en primate.

35 En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención no reaccionan de forma cruzada con IL-22R murino. De forma alternativa o adicional, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden unirse a uno o más homólogos de IL-22R de origen en primate, por ejemplo, las proteínas IL-22R de monos rhesus y cinomolgos. La reactividad cruzada con homólogos de otras especies puede ser particularmente ventajosa en el desarrollo y análisis de anticuerpos terapéuticos. Por ejemplo, el análisis preclínico

de toxicología de anticuerpos terapéuticos se lleva a cabo con frecuencia en especies de primate, incluidos, entre otros, monos rhesus y cinomolgos. Por lo tanto, la reactividad cruzada con estos homólogos de especies puede ser particularmente ventajosa para el desarrollo de anticuerpos como candidatos clínicos.

5 **Anticuerpos obtenidos de camélido**

En determinadas realizaciones de la invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento pueden comprender al menos un bucle hipervariable o región determinante de complementariedad obtenida de un dominio VH o un dominio VL de una especie de la familia *Camelidae*. En particular, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender dominios VH y/o VL, o las CDR de los mismos, obtenidos por inmunización activa de camélidos exogámicos, por ejemplo llamas, con un antígeno IL-22R o un fragmento del mismo.

Por "bucle hipervariable o región determinante de complementariedad obtenida de un dominio VH o un dominio VL de una especie de la familia *Camelidae*" se entiende que el bucle hipervariable (HV) o CDR tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica, a la secuencia de aminoácidos de un bucle hipervariable o CDR que está codificado por un gen de inmunoglobulina de *Camelidae*. En este contexto, "gen de inmunoglobulina" incluye genes de estirpe germinal, genes de inmunoglobulina que han experimentado un reordenamiento y también genes mutados somáticamente. Por tanto, la secuencia de aminoácidos del HV o CDR obtenida de un dominio VH o VL de una especie de *Camelidae* puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos de un HV o CDR presente en un anticuerpo convencional maduro de *Camelidae*. La expresión "obtenido de" en este contexto implica una relación estructural, en el sentido de que los HV o las CDR del anticuerpo para IL-22R incorporan una secuencia de aminoácidos (o variantes menores de la misma) que originalmente estaba codificada por un gen de inmunoglobulina de *Camelidae*. Sin embargo, esto no implica necesariamente una relación particular en términos del procedimiento de producción utilizado para preparar el anticuerpo para IL-22R.

Los anticuerpos para IL-22R obtenidos de camélido pueden obtenerse de cualquier especie de camélido, incluyendo, entre otros, llama, dromedario, alpaca, vicuña, guanaco o camello.

30 Los anticuerpos para IL-22R que comprenden dominios VH y VL obtenidos de camélido, o CDR de los mismos, son normalmente polipéptidos expresados de forma recombinante y pueden ser polipéptidos quiméricos. La expresión "polipéptido químico" se refiere a un polipéptido artificial (que no es de origen natural) que se crea por yuxtaposición de dos o más fragmentos peptídicos que de lo contrario no se encuentran contiguos. En esta definición se incluyen polipéptidos químicos de "especies" creados por yuxtaposición de fragmentos peptídicos codificados por dos o más especies, por ejemplo, camélido y ser humano.

35 Las CDR obtenidas de camélido pueden comprender una de las secuencias de CDR mostradas como las SEQ ID NO: 6 y 13 (CDR3 de cadena pesada), o las SEQ ID NO: 4 y 11 (CDR2 de cadena pesada) o las SEQ ID NO: 2 y 9 (CDR1 de cadena pesada), o una de las secuencias de CDR mostradas como las SEQ ID NO: 20 y 27 (CDR3 de cadena ligera), o las SEQ ID NO: 18, 25 y 47 (CDR2 de cadena ligera), o las SEQ ID NO: 16 y 23 (CDR1 de cadena ligera).

40 En una realización, el dominio VH completo y/o el dominio VL completo pueden obtenerse de una especie de la familia *Camelidae*. En ejemplos específicos, el dominio VH obtenido de camélido puede comprender la secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 29 y 31, mientras que el dominio VL obtenido de camélido puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 30, 32 y 62. El dominio VH obtenido de camélido y/o el dominio VL obtenido de camélido pueden luego someterse a ingeniería de proteínas, en la que se introducen una o más sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de camélido. Estos cambios diseñados técnicamente incluyen preferentemente sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de camélido. Dichos cambios incluyen "humanización" o "modificaciones de estirpe germinal (*germlining*)" donde uno o más restos de aminoácidos en un dominio VH o VL codificado por camélido se reemplazan por restos equivalentes de un dominio VH o VL homólogo codificado por ser humano. En determinados ejemplos, el dominio VH obtenido de camélido puede presentar al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como las SEQ ID NO: 29 o 31. De forma alternativa o adicional, el dominio VL obtenido de camélido puede presentar al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como las SEQ ID NO: 30, 32 o 62.

45 Los dominios VH y VL de camélido aislados obtenidos por inmunización activa de un camélido (por ejemplo, llama) con un antígeno IL-22R humano pueden utilizarse como base para el diseño técnico de polipéptidos de unión a antígeno de acuerdo con la invención. Partiendo de los dominios VH y VL de camélido intactos, es posible diseñar técnicamente una o más sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos que se apartan de la secuencia inicial de camélido. En determinadas realizaciones, tales sustituciones, inserciones o delecciones pueden estar presentes en las regiones marco conservadas del dominio VH y/o del dominio VL. El fin de tales cambios en la secuencia de aminoácidos primaria puede ser reducir propiedades presuntamente desfavorables (por ejemplo, inmunogenicidad en un hospedador humano (la denominada humanización), sitios de potencial heterogeneidad o inestabilidad del producto (glucosilación, desamidación, isomerización, etc.) o para potenciar alguna otra propiedad

- favorable de la molécula (por ejemplo, solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad, etc.). En otras realizaciones, los cambios en la secuencia de aminoácidos primaria pueden diseñarse técnicamente en uno o más de los bucles hipervariables (o CDR) de un dominio VH y/o VL de *Camelidae* obtenido mediante inmunización activa. Dichos cambios pueden introducirse para potenciar la afinidad y/o la especificidad de unión al antígeno, o para reducir 5 propiedades presuntamente desfavorables, por ejemplo, la inmunogenicidad en un hospedador humano (denominada humanización), sitios de potencial heterogeneidad o inestabilidad del producto, glucosilación, desamidación, isomerización, etc.) o para potenciar alguna otra propiedad favorable de la molécula, por ejemplo, solubilidad, estabilidad, biodisponibilidad, etc.
- 10 Por tanto, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo para IL-22R variante que contiene al menos una sustitución de aminoácido en al menos una región marco conservada o CDR del dominio VH o del dominio VL en comparación con un dominio VH o VL obtenido de camélido. Los ejemplos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, los dominios VH de camélido que comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas como las SEQ ID NO: 29 y 31, y los dominios VL de camélido que comprenden las secuencias de 15 aminoácidos mostradas como las SEQ ID NO: 30, 32 o 62.
- En otras realizaciones, se proporcionan moléculas de anticuerpos "químicas" que comprenden dominios VH y VL obtenidos de camélido (o variantes diseñadas técnicamente de los mismos) y uno o más dominios constantes de un anticuerpo que no es de camélido, por ejemplo, dominios constantes codificados por ser humano (o variantes 20 técnicamente diseñadas de los mismos). En tales realizaciones, se prefiere que tanto el dominio VH como el dominio VL se obtengan de la misma especie de camélido, por ejemplo, tanto el VH como el VL pueden ser de *Lama glama* o tanto el VH como el VL pueden ser de *Lama pacos* (antes de la introducción de la variación de la secuencia de aminoácidos diseñada técnicamente). En tales realizaciones, tanto el dominio VH como el VL pueden obtenerse de 25 un único animal, particularmente un único animal que se ha inmunizado activamente con un antígeno IL-22R.
- Como alternativa a los cambios diseñados técnicamente en la secuencia de aminoácidos primaria de los dominios VH y/o VL de *Camelidae*, pueden aislarse bucles hipervariables o CDR individuales obtenidos de camélido, o combinaciones de los mismos, de los dominios VH/VL de camélido y transferirse a un armazón alternativo (es decir, no de *Camelidae*), por ejemplo, un armazón de VH/VL humano, mediante injerto de CDR. En ejemplos particulares, 30 las CDR obtenidas de camélido pueden seleccionarse de las CDR que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran como las SEQ ID NO: 6 y 13 (CDR3 de cadena pesada), o las SEQ ID NO: 4 y 11 (CDR2 de cadena pesada) o las SEQ ID NO: 2 y 9 (CDR1 de cadena pesada), o una de las secuencias de CDR mostradas como las SEQ ID NO: 20 y 27 (CDR3 de cadena ligera), o las SEQ ID NO: 18, 25 y 47 (CDR2 de cadena ligera) o las SEQ ID 35 NO: 16 y 23 (CDR1 de cadena ligera).
- Los anticuerpos para IL-22R que comprenden dominios VH y VL obtenidos de camélido, o CDR de los mismos, pueden adoptar diversas realizaciones distintas en que está presente tanto un dominio VH como un dominio VL. El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y abarca, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, 40 anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), siempre que presenten la especificidad inmunológica apropiada para una proteína IL-22R. La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales 45 son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Adicionalmente, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epítopos) en el antígeno, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante o epítopo en el antígeno.
- Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, en general el dominio de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')2, Fab biespecíficos y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenarios, un fragmento variable monocatenario (scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmento 50 de anticuerpo (véase Holliger y Hudson, Nature Biotechnol. 23:1126-36 (2005)).
- En realizaciones no limitantes, Los anticuerpos para IL-22R que comprenden dominios VH y VL obtenidos de camélido, o CDR de los mismos, puede comprender dominios CH1 y/o dominios CL, cuya secuencia de aminoácidos es completa o sustancialmente humana. Cuando el polipéptido de unión a antígeno de la invención es un anticuerpo destinado a uso terapéutico en humanos, es típico que la región constante completa del anticuerpo, o al menos una parte de la misma, tenga una secuencia de aminoácidos completa o sustancialmente humana. Por lo tanto, uno o más o cualquier combinación del dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3 y el dominio CL (y el dominio CH4 si está presente) pueden ser completa o sustancialmente humanos con respecto a su secuencia de aminoácidos. 55
- Ventajosamente, el dominio CH1, la región bisagra, el dominio CH2, el dominio CH3 y el dominio CL (y el dominio CH4 si está presente) pueden tener todos una secuencia de aminoácidos completa o sustancialmente humana. En el 65

contexto de la región constante de un anticuerpo humanizado o quimérico, o un fragmento de anticuerpo, la expresión "sustancialmente humano" se refiere a una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 90 %, o al menos el 92 %, o al menos el 95 % o al menos el 97 %, o al menos el 99 % con una región constante humana. La expresión "secuencia de aminoácidos humana", en este contexto, se refiere a una secuencia de aminoácidos que

5 está codificada por un gen de inmunoglobulina humana, que incluye genes de la estirpe germinal, reordenados y con mutaciones somáticas. La invención también contempla polipéptidos que comprenden dominios constantes de secuencia "humana" que se han alterado, por una o más adiciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia humana, excepto las realizaciones en que se precisa expresamente la presencia de una

10 región bisagra "completamente humana".

La presencia de una región bisagra "completamente humana" en los anticuerpos para IL-22R de la invención puede ser beneficiosa tanto para reducir al mínimo la inmunogenicidad como para optimizar la estabilidad del anticuerpo. Como se analiza en otra parte en el presente documento, se contempla que puedan hacerse una o más sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos dentro de la región constante de la cadena pesada y/o ligera, particularmente dentro de la región Fc. Las sustituciones de aminoácido pueden dar como resultado el reemplazo del aminoácido sustituido por un aminoácido de origen natural distinto, o por un aminoácido no natural o modificado. También están permitidas otras modificaciones estructurales, tales como, por ejemplo, cambios en el patrón de glucosilación (por ejemplo, mediante adición o delección de sitios de glucosilación unidos en N u O). Dependiendo del uso pretendido del anticuerpo del anticuerpo, puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a sus propiedades de unión a receptores Fc, por ejemplo, para modular la función efectora. Por ejemplo, pueden introducirse un resto (o restos) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción de células mediada por el complemento y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, forma siglada de *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) aumentadas. Véase Caron *et al.*, J. Exp. Med. 176:1191 -1195 (1992) y Shope, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Además, en el presente documento se describen inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjungado). Las regiones Fc también pueden diseñarse técnicamente para prolongar la semivida, como lo describen Chan y Carter, Nature Reviews: Immunology, Vol. 10, pág. 301-316, 2010.

En otra realización más, se modifica la región Fc para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc modificando uno o más aminoácidos. En realizaciones alternativas, la región Fc puede diseñarse técnicamente de manera que no haya función efectora. Un anticuerpo para IL-22R que no tiene función efectora de Fc puede ser particularmente útil como agente bloqueante del receptor. En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden tener una región Fc obtenida de isotipos de IgG de origen natural que tienen una función efectora reducida, por ejemplo, de IgG4. Las regiones Fc obtenidas de IgG4 pueden modificarse adicionalmente para aumentar la utilidad terapéutica, por ejemplo, mediante la introducción de modificaciones que reducen al mínimo el intercambio de brazos entre moléculas de IgG4 *in vivo*.

En aún otra realización, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno diana. Dichas modificaciones de hidratos de carbono pueden conseguirse por; por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación del armazón de la región variable para eliminar así la glucosilación en este sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

Además, se contemplan anticuerpos para IL-22R variantes que tienen un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo total o parcialmente desfucosilado (como describen Natsume *et al.*, Drug Design Development and Therapy, Vol. 3, pág. 7-16, 2009) o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNac bisectadas aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glucosilación alterada aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos, produciendo normalmente una potenciación de 10 veces de la ADCC con respecto a un anticuerpo equivalente que comprende un dominio Fc humano "nativo". Dichas modificaciones de hidratos de carbono pueden llevarse a cabo, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria enzimática de glucosilación alterada (como describen Yamane-Ohnuki y Satoh, mAbs 1:3, 230-236, 2009). Los ejemplos de anticuerpos no fucosilados con función de ADCC potenciada son los producidos utilizando la tecnología Potelligent™ de BioWa Inc.

La invención puede, en determinadas realizaciones, abarcar anticuerpos de Camelidae/ser humano quiméricos y, en particular, anticuerpos quiméricos en que los dominios VH y VL son de secuencia completamente de camélido (por ejemplo, llama o alpaca) y el resto del anticuerpo es de secuencia completamente de ser humano. Los anticuerpos para IL-22R pueden incluir anticuerpos que comprenden variantes "humanizadas" o "con modificaciones de estirpe germinal" de dominios VH y VL obtenidos de camélido, o CDR de los mismos, y anticuerpos quiméricos de

camélido/ser humano, en que los dominios VH y VL contienen una o más sustituciones de aminoácidos en las regiones marco conservadas en comparación con los dominios VH y VL de camélido obtenidos por inmunización activa de un camélido con un antígeno IL-22R o un fragmento del mismo. Dicha "humanización" aumenta el % de identidad de secuencia con los dominios VH o VL de la estirpe germinal humana reemplazando restos de

5 aminoácidos no coincidentes en un dominio VH o VL de *Camelidae* de partida por el resto equivalente encontrado en un dominio VH o VL codificado por la estirpe germinal humana. Los anticuerpos para IL-22R también pueden ser anticuerpos injertados con CDR en que las CDR (o bucles hipervariables) obtenidas de un anticuerpo de camélido, o codificadas de otro modo por un gen de camélido, se injertan en un armazón de VH y VL humanos, siendo el resto 10 del anticuerpo también de origen completamente humano. Dichos anticuerpos para IL-22R injertados con CDR pueden contener CDR que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas como las SEQ ID NO: 6 y 13 (CDR3 de cadena pesada), o las SEQ ID NO: 4 y 11 (CDR2 de cadena pesada) o las SEQ ID NO: 2 y 9 (CDR1 de cadena pesada), o una de las secuencias de CDR mostradas como las SEQ ID NO: 20 y 27 (CDR3 de cadena ligera), o las SEQ ID NO: 18, 25 y 47 (CDR2 de cadena ligera) o las SEQ ID NO: 16 y 23 (CDR1 de cadena ligera).

15 Los anticuerpos humanizados, químicos e injertados con CDR para IL-22R, como se describe anteriormente, particularmente anticuerpos que comprenden bucles hipervariables o CDR obtenidas de la inmunización activa de camélidos, pueden producirse fácilmente utilizando técnicas convencionales de manipulación y expresión de ADN recombinante, haciendo uso de células hospedadoras procarióticas y eucarióticas diseñadas técnicamente para producir el polipéptido de interés y que incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, células de levadura, células 20 de mamífero, células de insecto, células vegetales, algunas de ellas como se describen en el presente documento y se ilustran en los ejemplos adjuntos.

25 Los anticuerpos para IL-22R obtenidos de camélido incluyen variantes donde el bucle (o bucles) hipervariable o la CDR (o las CDR) del dominio VH y/o el dominio VL se obtienen a partir de un anticuerpo de camélido convencional generado contra IL-22R humano, pero donde al menos uno de dichos bucles o CDR hipervariables (obtenidos de camélido) se ha diseñado técnicamente para incluir una o más sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos con respecto a la secuencia codificada por camélido. Dichos cambios incluyen la "humanización" de los bucles/CDR hipervariables. Los HV/CDR obtenidos de camélido que se han diseñado técnicamente de esta manera todavía 30 pueden presentar una secuencia de aminoácidos que es "sustancialmente idéntica" a la secuencia de aminoácidos de un HV/CDR codificado por camélido. En este contexto, la "identidad sustancial" puede permitir no más de una, o no más de dos faltas de coincidencia de secuencia de aminoácidos con el HV/CDR codificado por camélido. Los ejemplos particulares del anticuerpo para IL-22R pueden contener variantes humanizadas de las secuencias de CDR mostradas como las SEQ ID NO: 6 y 13 (CDR3 de cadena pesada), o las SEQ ID NO: 4 y 11 (CDR2 de cadena pesada) o las SEQ ID NO: 2 y 9 (CDR1 de cadena pesada), o una de las secuencias de CDR mostradas como las SEQ ID NO: 20 y 27 (CDR3 de cadena ligera), o las SEQ ID NO: 18, 25 y 47 (CDR2 de cadena ligera) o las SEQ ID 35 NO: 16 y 23 (CDR1 de cadena ligera).

40 Los anticuerpos para IL-22R obtenidos de camélido proporcionados en el presente documento pueden ser de cualquier isótipo. Los anticuerpos destinados al uso terapéutico en humanos serán normalmente del tipo IgA, IgD, IgE IgG, IgM, a menudo del tipo IgG, en cuyo caso pueden pertenecer a cualquiera de las cuatro subclases IgG1, IgG2a y b, IgG3 o IgG4. Dentro de cada una de estas subclases se permite realizar una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos dentro de la porción Fc, o para realizar otras modificaciones estructurales, por ejemplo, para potenciar o reducir las funcionalidades dependientes del Fc.

45 Anticuerpos para IL-22R preferidos - 230C9 y 223G5 y anticuerpos relacionados con los mismos

50 Los anticuerpos para IL-22R preferidos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención son variantes humanizadas y variantes con modificaciones de estirpe germinal de los anticuerpos obtenidos de camélido descritos en el presente documento. Las variantes humanizadas y con modificaciones de estirpe germinal presentan una alta homología humana y, preferentemente, presentan una alta homología con moléculas de IgG humanas, más preferentemente IgG1. En determinadas realizaciones, los anticuerpos para IL-22R preferidos y los fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con la presente invención comprenden bucles hipervariables o CDR que tienen pliegues canónicos humanos o similares a los humanos, como se describe en otra parte del presente documento.

55 Los anticuerpos para IL-22R preferidos de acuerdo con la presente invención pueden presentar una identidad de secuencia de aminoácidos del 93 % o más con uno o más dominios VH humanos, particularmente en las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 e FR4. De forma alternativa o adicional, los anticuerpos para IL-22R preferidos pueden presentar una identidad de secuencia de aminoácidos del 96 % o más con uno o más dominios VL humanos, particularmente en las regiones marco conservadas FR1, FR2, FR3 e FR4. Los anticuerpos para IL-22R preferidos de acuerdo con la presente invención pueden presentar una identidad de secuencia de aminoácidos del 93 % o más con uno o más dominios VH humanos, y una identidad de secuencia de aminoácidos combinada del 93 % o más con uno o más dominios VH humanos y uno o más dominios VL humanos, particularmente cuando la identidad de secuencia se determina a través de las regiones marco conservadas.

65 Debido a la alta homología humana, los anticuerpos para IL-22R preferidos proporcionados en el presente

documento presentan baja inmunogenicidad, según lo evaluado por la plataforma Epibase™ de Ionza (puntuación de DRB-1) utilizando la configuración de "HLA class II - Caucasian v3.0". En determinadas realizaciones, los anticuerpos para IL-22R de la invención presentan una puntuación de DRB-1 de menos de 950, preferentemente de menos de 850, más preferentemente de menos de 750, muy preferentemente de menos de 650.

5 Los anticuerpos para IL-22R preferidos de la invención son anticuerpos monoclonales que contienen una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3 de una IgG humana, preferentemente una IgG1. En determinadas realizaciones, la región Fc del anticuerpo monoclonal no tiene función efectora, es decir, es un Fc nulo. Esto es particularmente útil para anticuerpos bloqueantes terapéuticos.

10 Los anticuerpos para IL-22R preferidos y los fragmentos de unión a antígeno de la invención presentan una combinación de propiedades que los hacen superiores a los anticuerpos para IL-22R descritos en la técnica anterior. Los anticuerpos para IL-22R preferidos y los fragmentos de unión a antígeno de la invención pueden presentar la siguiente combinación de propiedades:

- 15 (i) unión a un epítopo dentro de la proteína IL-22R que no incluye la Tyr60;
 (ii) unión a un epítopo ubicado al menos en parte en el dominio D2 de la proteína IL-22R;
 (iii) alta afinidad de unión a IL-22R humano;
 (iv) inhibición de la activación de IL-22R dependiente de IL-22 y activación de IL-22R dependiente de IL-20;
 20 (v) sin reactividad cruzada con IL-22R murino; y
 (vi) reactividad cruzada con IL-22R de monos rhesus y cinomolgos.

25 Los anticuerpos para IL-22R de la invención preferidos pueden unirse a un epítopo que no incluye el resto crucial Tyr60. Los anticuerpos para IL-22R de la invención preferidos pueden unirse a un epítopo que se encuentra al menos en parte en el dominio D2 de IL-22R, donde el dominio D2 es del aminoácido 125 al aminoácido 228 de la SEQ ID NO: 71. Los anticuerpos para IL-22R de la invención preferidos también pueden unirse a IL-22R humano con alta afinidad, presentando normalmente una constante de disociación (donde la k_{off} se mide por Biacore) para IL-22R humano de menos de $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ cuando se mide como mAb. En determinadas realizaciones, los anticuerpos para IL-22R de la invención preferidos se unen a IL-22R humano con alta afinidad presentando una constante de disociación (donde la k_{off} se mide por Biacore) para IL-22R humano en el intervalo de $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ a $2,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. En determinadas realizaciones, los anticuerpos para IL-22R preferidos de la invención se unen a IL-22R humano presentando un valor de K_D inferior a $5 \times 10^{-10} \text{ M}$.

30 35 Los anticuerpos para IL-22R preferidos también pueden inhibir la activación de IL-22R dependiente de IL-22 e IL-20, y normalmente presentan una actividad inhibidora para la activación dependiente de IL-20 que es menos de cuatro veces mayor que la actividad inhibidora presentada para la activación dependiente de IL-22. Los anticuerpos para IL-22R preferidos pueden unirse a IL-22R humano con alta afinidad y reaccionar de forma cruzada con homólogos de especies de IL-22R de monos rhesus y cinomolgos, pero no reaccionan de forma cruzada con IL-22R murino.

40 45 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de acuerdo con la presente invención comprenden al menos un dominio variable de cadena pesada (VH) y al menos un dominio variable de cadena ligera (VL) donde el dominio VH comprende:

- una CDR3 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [VGFSGTYYSES], la SEQ ID NO: 6,
- una CDR2 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [SIYNDASNTAYSDSVKG], la SEQ ID NO: 36,
- una CDR1 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [SYDMN], la SEQ ID NO: 34,

50 55 y el dominio VL comprende:

- una CDR3 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [QSGSSSSNAV], la SEQ ID NO: 54,
- una CDR2 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [GQNNRPS], la SEQ ID NO: 47,
- una CDR1 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [QGGYYAH], la SEQ ID NO 16.

60 65 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que tienen las secuencias de CDR de los dominios VH y VL como se definen anteriormente pueden comprender un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 63 y/o un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 64. En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo el dominio variable de cadena pesada una secuencia de VH con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos

- el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 63 y/o el dominio variable de cadena ligera que comprende una VL con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 64. Para las 5 realizaciones donde los dominios de los anticuerpos o de los fragmentos de unión a antígeno se definen mediante un porcentaje particular de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, los dominios VH y/o VL pueden conservar secuencias de CDR idénticas a las presentes en la secuencia de referencia, de modo que la variación está presente solo dentro de las regiones marco conservadas.
- 10 Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que tienen las secuencias CDR de dominios VH y VL como se definen anteriormente pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 y/o una cadena ligera de inmunoglobulina de longitud completa que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68. En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporcionan anticuerpos que comprenden 15 una cadena pesada con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 67 y/o una cadena ligera con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada 20 como SEQ ID NO: 68.

Para las realizaciones donde las cadenas de los anticuerpos se definen mediante un porcentaje particular de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden conservar secuencias de CDR idénticas a las presentes en la secuencia de referencia, de modo que la variación está presente 25 solo fuera de las regiones CDR.

En determinados ejemplos, determinados anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento comprenden al menos un dominio variable de cadena pesada (VH) y al menos un dominio variable de cadena ligera (VL) donde el dominio VH comprende:

- 30 - una CDR3 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [PPGPKAHYNGAKY], la SEQ ID NO: 43,
- una CDR2 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [GIHISGGITYYTDSVKG], la SEQ ID NO: 41,
- 35 - una CDR1 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [SYFMS], la SEQ ID NO: 9,

y el dominio VL comprende:

- 40 - una CDR3 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [ASYRLYADYV], la SEQ ID NO: 27,
- una CDR2 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [EVNKRSS], la SEQ ID NO: 59,
- 45 - una CDR1 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [TGTSSDIGSYNYVS], la SEQ ID NO 57.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que tienen las secuencias de CDR de los dominios VH y VL como se definen anteriormente pueden comprender un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 65 y/o un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 66. En determinados 50 ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera, comprendiendo el dominio variable de cadena pesada una secuencia de VH con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 65 y/o el dominio 55 variable de cadena ligera que comprende una VL con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 66. Para las realizaciones donde los dominios de los anticuerpos o de los fragmentos de unión a antígeno se definen mediante un porcentaje particular de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, los dominios VH y/o VL pueden conservar 60 secuencias de CDR idénticas a las presentes en la secuencia de referencia, de modo que la variación está presente solo dentro de las regiones marco conservadas.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que tienen las secuencias CDR de dominios VH y VL como se definen anteriormente pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69 y/o una cadena ligera de inmunoglobulina de longitud completa que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID 65

NO: 70. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos que comprenden una cadena pesada con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 69 y/o una cadena ligera con al menos el 85 % de identidad de secuencia, o al menos el 90 % de identidad de secuencia, o al menos el 95 % de identidad de secuencia, o al menos el 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 70.

5 Para las realizaciones donde las cadenas de los anticuerpos se definen mediante un porcentaje particular de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden conservar secuencias de CDR idénticas a las presentes en la secuencia de referencia, de modo que la variación está presente solo fuera de las regiones CDR.

10

Anticuerpos que compiten de forma cruzada

15 Además, se describen anticuerpos (monoclonales) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten de forma cruzada con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento.

20 En particular, en el presente documento se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen al receptor de citocinas IL-22R y compiten de forma cruzada con anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprenden una combinación de CDR3 de cadena pesada variable (HCDR3), CDR2 de cadena pesada variable (HCDR2) y CDR1 de cadena pesada variable (HCDR1), CDR3 de cadena ligera variable (LCDR3), CDR2 de cadena ligera variable (LCDR2) y CDR1 de cadena ligera variable (LCDR1), donde la combinación se selecciona del grupo que consiste en:

- 25
- (i) HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 43; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 41; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 9; LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 27; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 59; LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 57; y

30

 - (ii) HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 13; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 11; HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 9; LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 27; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 25; LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 23.

35 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen al receptor de citocinas IL-22R y compiten de forma cruzada con anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos que comprenden al menos un dominio variable de cadena pesada (VH) y al menos un dominio variable de cadena ligera (VL) donde el dominio VH comprende:

- 40
- una CDR3 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [PPGPFKAHYNGAKY], la SEQ ID NO: 43,
 - una CDR2 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [GIHISGGITYYTDSVKG], la SEQ ID NO: 41,
 - una CDR1 de cadena pesada variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [SYFMS], la SEQ ID NO: 9,

45 y el dominio VL comprende:

- 50
- una CDR3 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [ASYRLYADYV], la SEQ ID NO: 27,
 - una CDR2 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [EVNKRSS], la SEQ ID NO: 59,
 - una CDR1 de cadena ligera variable que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos [TGTSSDIDGSNYVS], la SEQ ID NO 57.

55 Los anticuerpos que compiten de forma cruzada o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden competir con anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio VH que comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 65 y/o un dominio VL que comprende o consiste en la secuencia de la SEQ ID. NO: 66. Los anticuerpos que compiten de forma cruzada o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden competir con anticuerpos que tienen una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 69 y/o una cadena ligera de inmunoglobulina de longitud completa que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70.

65 Los anticuerpos que compiten de forma cruzada son los que se unen a IL-22R en un sitio (o sitios) que solapa o es idéntico al sitio (o sitios) en los que se unen los presentes anticuerpos para IL-22R. Los anticuerpos (monoclonales) que compiten o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden identificarse, por ejemplo, mediante un ensayo de competición de anticuerpos. Por ejemplo, un antígeno para IL-22R o un fragmento del mismo se puede unir a un soporte sólido. A continuación, se añaden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la

presente invención y un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se sospecha que puede competir con tal anticuerpo de la invención. Una de las dos moléculas se marca. Si el compuesto marcado y el compuesto no marcado se unen en sitios distintos y diferenciados en el antígeno IL-22R, el compuesto marcado se unirá al mismo nivel esté presente o no el compuesto que se sospecha competidor. Sin embargo, si los sitios de interacción son idénticos (o solapantes), el compuesto no marcado competirá, y la cantidad de compuesto marcado unido al antígeno se reducirá. Si el compuesto no marcado está presente en exceso, muy poco, si es que hay alguno, compuesto etiquetado se unirá. Para los fines de la presente invención, los anticuerpos monoclonales que compiten o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos son los que disminuyen la unión de los presentes anticuerpos para IL-22R en aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, 10 aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 % o aproximadamente el 99 %. Los detalles de procedimientos para llevar a cabo tales ensayos de competición son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, páginas 567-569, ISBN 0-87969-314-2. Dichos ensayos pueden hacerse cuantitativos usando anticuerpos purificados. Se establece una curva patrón 15 titulando un anticuerpo contra sí mismo, es decir, se usa el mismo anticuerpo tanto para la marca como para el competidor. Se titula la capacidad de un anticuerpo monoclonal que compite no marcado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de inhibir la unión de la molécula marcada a la placa. Los resultados se representan gráficamente, y se comparan las concentraciones necesarias para conseguir el grado deseado de inhibición de la unión.

20 Polinucleótidos que codifican anticuerpos para IL-22R

La invención también proporciona moléculas polinucleotídicas que codifican los anticuerpos para IL-22R de la invención o fragmentos de los mismos, también vectores de expresión que contienen dichas secuencias de nucleótidos de la invención unidas operativamente a secuencias reguladoras que permiten la expresión de los anticuerpos o fragmentos de los mismos en una célula hospedadora o sistema de expresión sin células, y una célula hospedadora o sistema de expresión si células que contiene este vector de expresión.

25 En los ejemplos particulares descritos en el presente documento, el polinucleótido que codifica el anticuerpo para IL-22R puede comprender una o más de las secuencias polinucleotídicas que se muestran como las SEQ ID NO: 52, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 u 81, cuyas secuencias codifican dominios VH o VL de anticuerpos para IL-22R.

30 En determinados ejemplos descritos en el presente documento, el polinucleótido que codifica el anticuerpo para IL-22R puede comprender una secuencia variante que codifica un dominio VH o VL funcional de un anticuerpo para IL-22R, donde dicha secuencia variante presenta al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % de identidad de secuencia cuando se alinea de manera óptima con una cualquiera de las SEQ ID NO: 52, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 u 81.

35 En este contexto, el % de identidad de secuencia entre dos secuencias de polinucleótido puede determinarse comparando estas dos secuencias alineadas de una manera óptima y en que la secuencia de polinucleótido a comparar puede comprender adiciones o delecciones con respecto a la secuencia de referencia para un alineamiento óptimo entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las que el resto nucleotídico es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias. Por ejemplo, es posible utilizar 40 el programa BLAST, "Secuencias BLAST 2" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en el sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, siendo los parámetros utilizados los proporcionados por defecto (en particular para los parámetros "penalización por apertura de hueco": 5, y "penalización por extensión de hueco": 2; siendo la matriz elegida, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), calculándose el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar directamente mediante el programa.

45 En determinados ejemplos descritos en el presente documento, el dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos para IL-22R o fragmentos de unión a antígeno están codificados por una combinación de primera y segunda secuencias polinucleotídicas, donde la primera y segunda secuencias polinucleotídicas se seleccionan de las siguientes parejas:

- (i) un primer polinucleótido que codifica un dominio de cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO: 52 y un segundo polinucleótido que codifica un dominio de cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO: 73;
- (ii) un primer polinucleótido que codifica un dominio de cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO: 74 y un segundo polinucleótido que codifica un dominio de cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO: 75;
- (iii) un primer polinucleótido que codifica un dominio de cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO: 76 y un segundo polinucleótido que codifica un dominio de cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO: 77;
- (iv) un primer polinucleótido que codifica un dominio de cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO:

78 y un segundo polinucleótido que codifica un dominio de cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO: 79; o

(v) un primer polinucleótido que codifica un dominio de cadena pesada variable que comprende la SEQ ID NO: 80 y un segundo polinucleótido que codifica un dominio de cadena ligera variable que comprende la SEQ ID NO: 81.

Las moléculas polinucleotídicas que codifican los anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, moléculas de ADN recombinante. Las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido" o "molécula polinucleotídica" se usan en el presente documento indistintamente y se refieren a cualquier molécula de ADN o ARN, monocatenaria o bicatenaria y, si es monocatenaria, la molécula de su secuencia complementaria. En el análisis de las moléculas de ácido nucleico, una secuencia o estructura de una molécula de ácido nucleico particular puede describirse en el presente documento de acuerdo con la convención normal de proporcionar la secuencia en la dirección de 5' a 3'. En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos o polinucleótidos están "aislados". Este término, cuando se aplica a una molécula de ácido nucleico, se refiere a una molécula de ácido nucleico que está separada de secuencias con las que está inmediatamente contigua en el genoma de origen natural del organismo en que se origina. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un plásmido o vector vírico, o integrada en el ADN genómico de una célula procariótica o eucariótica u organismo hospedador no humano. Cuando se aplica a ARN, la expresión "polinucleótido aislado" se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada como se define anteriormente. Como alternativa, la expresión puede referirse a una molécula de ARN que se ha purificado/separado de otros ácidos nucleicos con los que estaría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos). Un polinucleótido aislado (ya sea ADN o ARN) puede representar además una molécula producida directamente por medios biológicos o sintéticos y separada de otros componentes presentes durante su producción.

Para la producción recombinante de un anticuerpo de acuerdo con la invención, puede prepararse un polinucleótido recombinante que lo codifica (utilizando técnicas convencionales de biología molecular) e insertarse en un vector replicable para la expresión en una célula hospedadora elegida, o en un sistema de expresión sin células. Las células hospedadoras adecuadas pueden ser procarióticas, levaduras o células eucarióticas superiores, específicamente células de mamífero. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, vacaciones *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de mieloma de ratón SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287) o NS0 (colecciones de cultivo la HPA n.º 85110503); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2), así como la línea celular PERC-6 de DSM. Los vectores de expresión adecuados para su uso en cada una de estas células hospedadoras también son conocidos en general en la técnica.

Debe apreciarse que la expresión "célula hospedadora" en general se refiere a una línea celular cultivada. Los seres humanos completos en que se ha introducido un vector de expresión que codifica un polipéptido de unión a antígeno de acuerdo con la invención se excluyen explícitamente de la definición de una "célula hospedadora".

Producción de anticuerpos

En un aspecto importante, la invención también proporciona un método de producción de anticuerpos de la invención que comprende el cultivo de una célula hospedadora (o sistema de expresión sin células) que contiene un polinucleótido (por ejemplo, un vector de expresión) que codifica el anticuerpo en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo y la recuperación del anticuerpo expresado. Este procedimiento de expresión recombinante puede utilizarse para la producción de anticuerpos a gran escala, incluyendo anticuerpos para IL-22R de acuerdo con la invención, incluyendo anticuerpos monoclonales destinados a uso terapéutico humano. Los vectores, líneas celulares y procedimientos de producción adecuados para la fabricación a gran escala de anticuerpos recombinantes adecuados para uso terapéutico *in vivo* están disponibles en general en la técnica y los expertos en la materia los conocerán.

Utilidad terapéutica de los anticuerpos para IL-22R

Los anticuerpos para IL-22R proporcionados en el presente documento pueden utilizarse como medicamentos, particularmente para su uso en el tratamiento o la profilaxis de trastornos en que la patología es atribuible a la señalización desregulada a través de los complejos de IL-22R de la superficie celular. Dicha señalización desregulada puede estar vinculada con la sobreexpresión o sobreproducción de una cualquiera de las citocinas IL-22, IL-20 y/o IL-24.

El término "tratar" o "tratamiento" significa ralentizar, interrumpir, detener, controlar, parar, reducir la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad, pero no implica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas relacionados con las enfermedades, afecciones o trastornos. El término "profilaxis" significa prevenir la aparición de un trastorno, afección o enfermedad o prevenir la aparición de síntomas asociados con un trastorno, afección o enfermedad.

5 Los ligandos que señalizan a través de IL-22R se han implicado en una serie de enfermedades y dado que IL-22R se expresa de forma selectiva en la piel y las células epiteliales, las enfermedades clave son las que afectan la piel y el epitelio, incluidas, entre otras, la psoriasis, la artritis psoriásica y la dermatitis atópica. Se han encontrado altos niveles de IL-22 en placas psoriásicas humanas (Boniface *et al.*, Clin Exp Immunol. 150: 407-415 (2007)) y la participación de esta citocina en la patogenia de la psoriasis se ha demostrado experimentalmente en modelos de ratón de inflamación de la piel (Ma *et al.*, J Clin Invest. 118: 597-607 (2008); Van Belle *et al.* J Immunol. 1 de enero; 188(1):462-9 (2012)).

10 15 En el presente documento se proporcionan anticuerpos o antígenos de la presente invención para su uso en el tratamiento o la profilaxis de la psoriasis, la artritis psoriásica o la dermatitis atópica. En determinados ejemplos, el presente documento se describen métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel. En determinados ejemplos, en el presente documento se describen métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel seleccionadas de psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis de contacto o dermatitis atópica en un sujeto humano. Los métodos comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos para IL-22R o fragmentos de unión a antígeno como se define en otra parte del presente documento. Todos los ejemplos de anticuerpos para IL-22R o fragmentos de unión a antígeno como se describen en el presente documento son igualmente aplicables a los métodos de tratamiento descritos en el presente documento.

20 25 30 35 En determinados ejemplos, en el presente documento se describen métodos de tratamiento del síndrome de Sjorgen, o de cánceres seleccionados de hepatocarcinoma, liposarcoma, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de colon y colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células pequeñas y grandes, cáncer de mama, glioblastoma, linfoma cutáneo de linfocitos T, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de células del manto, en un sujeto humano, métodos que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos para IL-22R o fragmentos de unión a antígeno como se define en otra parte del presente documento. Todos los ejemplos de anticuerpos para IL-22R o fragmentos de unión a antígeno como se describen en el presente documento son igualmente aplicables a los métodos de tratamiento descritos en el presente documento.

40 45 Para el uso terapéutico en seres humanos, los anticuerpos para IL-22R descritos en el presente documento se pueden administrar a un sujeto humano que necesite tratamiento en una "cantidad eficaz". La expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de un anticuerpo para IL-22R que, tras la administración de una dosis única o múltiple a un paciente humano, proporciona eficacia terapéutica en el tratamiento de la enfermedad. Las cantidades terapéuticamente eficaces del anticuerpo para IL-22R pueden comprender una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg por dosis única. La cantidad de anticuerpo administrada en cualquier punto de tiempo dado puede variarse para que las cantidades óptimas de anticuerpo para IL-22R, ya sea empleado solo o en combinación con cualquier otro agente terapéutico, se administren durante el transcurso del tratamiento.

50 Además, se contempla administrar los anticuerpos para IL-22R descritos en el presente documento, o composiciones farmacéuticas que comprenden tales anticuerpos, en combinación con cualquier otro tratamiento adecuado para las enfermedades identificadas anteriormente, como terapia de combinación.

Composiciones farmacéuticas

55 El alcance de la invención incluye composiciones farmacéuticas, que contienen uno o una combinación de anticuerpos para IL-22R de la invención, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, formuladas con uno o más transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más distintos) anticuerpos para IL-22R. Las técnicas para formular anticuerpos monoclonales para uso terapéutico humano son bien conocidas en la técnica y se revisan, por ejemplo, en Wang *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 96, pág. 1-26, 2007.

60 65 En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan para la administración a un sujeto a través de cualquier vía de administración adecuada incluyendo, pero sin limitación, inyección intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, administración subcutánea, epidural, nasal, oral, rectal, tópica, inhalatoria, bucal (por ejemplo, sublingual) y transdérmica. En realizaciones preferidas, la composición está formulada para administración subcutánea.

Ejemplos

La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 Inmunización de llama

- 5 Se inmunicaron dos llamas con una mezcla de proteína IL22R humana recombinante (R&D systems) y Fn14-Fc humana de acuerdo con el esquema de inmunización que se muestra a continuación en la Tabla 5. Después de seis inyecciones semanales de proteínas recombinantes, se recogió sangre y se utilizaron los sueros de las llamas inmunicadas para medir la respuesta inmunitaria humoral contra IL22R detectando la presencia de anticuerpos contra el antígeno de inmunización antes de la inmunización y después de la inmunización. Ambas llamas produjeron una respuesta inmunitaria significativa y específica contra IL22R.
- 10
- 10
- 15
- 20
- 25

Tabla 5 Calendario de inmunización para cada llama

Semana	Fecha	Día	Antígeno	Recolección de tejido
				10 ml de sangre preinmune (suero)
39	29/09/10	0	IL-22R(80 µg) +Fn14-Fc (80 µg)	-
40	07/10/10	8	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
41	14/10/10	15	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
42	21/10/10	22	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
43	28/10/10	29	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
44	04/11/10	36	IL-22R(40 µg) +Fn14-Fc (40 µg)	-
45	08/11/10	40		400 ml de sangre inmune 10 ml de sangre inmune (plasma)

15 Ejemplo 2 Construcción y selección de bibliotecas

- Después de la inmunización, se recogieron las CMSP y se extrajo ARN. Se llevó a cabo una síntesis de ADNc con cebadores aleatorios y se amplificaron por PCR los segmentos génicos de VHCH1, VλCλ y VkCk de llama. Se utilizaron dos enfoques para amplificar por PCR las cadenas ligera. El primer enfoque utilizó una amplificación por PCR primaria con cebadores sin enlazadores con sitios de restricción, seguido de amplificación por PCR con cebadores etiquetados con sitios de restricción (ApaLI y Ascl). Para el segundo enfoque, se utilizaron cebadores etiquetados para amplificar ADNc directamente. Las bibliotecas de VHCH1 se crearon mediante una PCR de dos etapas, en que se llevaron a cabo 25 ciclos con cebadores no etiquetados seguidos de 10 ciclos utilizando versiones etiquetadas de estos cebadores (que contienen sitios de restricción Sfil y NotI) (véase el documento WO2010/001251).

Las cadenas ligeras amplificadas por PCR se digirieron con ApaLI y Ascl, mientras que las cadenas pesadas amplificadas por PCR se digirieron con Sfil y NotI, y se combinaron en una biblioteca de Fab clonando el inserto de la biblioteca de cadenas ligeras en el vector pCB3 de la biblioteca de cadenas pesadas utilizando los sitios de restricción ApaLI y Ascl. Se descubrió que las bibliotecas de Fab finales tenían la diversidad necesaria de $>10^9$ clones distintos.

Después de la construcción de la biblioteca, se produjeron fagos y la selección por presentación de fagos se realizó sobre IL22R humano (Biotechne, 2770-LR). Para la selección de clones específicos para IL22R, se recubrió IL22R humano (i) directamente sobre una placa MaxiSorp™ (Nunc); o (ii) se capturó con un anticuerpo anti-IL22R humano no competitivo (MAB2770, R&D systems); o (iii) se capturó con neutravidina después de biotinilación. El recubrimiento y la captura de IL22R generalmente se realizó en dos concentraciones distintas; por ejemplo, 5 µg/ml y 0,1 µg/ml.

40 Despues de la primera ronda de selección no se observó un enriquecimiento claro, pero después de la segunda y tercera ronda, se observaron enriquecimientos dependientes de la dosis en todas las bibliotecas; hasta 100 veces después de la segunda ronda y 10.000 veces después de la tercera ronda. Se descubrió que los enriquecimientos en el IL22R capturado con anticuerpo eran mayores en comparación con los del IL22R recubierto directamente. Esto podría deberse al hecho de que IL22R tiene solo 25 kDa y el recubrimiento directo afecta su conformación o limita el epítopo disponible. Por lo tanto, se realizó una tercera campaña de selección utilizando hIL22R biotinilado.

Además de las selecciones descritas anteriormente, se realizaron dos rondas adicionales de selección sobre IL22R de ratón recombinante biotinilado después de una primera ronda de selección sobre IL-22R humano capturado con MAB2770. Esta selección se realizó para identificar Fab con reactividad cruzada con IL22R de ratón. Como control positivo de las selecciones, se llevó a cabo en paralelo una selección sobre IL-22R humano-biotina capturado con neutravidina. En general, el procedimiento de selección fue muy satisfactorio con un enriquecimiento significativo observado para moléculas de unión Fab de IL22R.

Ejemplo 3 Cribado de Fab específicos para IL22R

Después de la selección satisfactoria por presentación de fagos, se sometieron a ensayo los Fab presentes en el periplasma en cuanto a su capacidad para bloquear la unión de IL-22 al IL22R. Además, se llevó a cabo un cribado para identificar la unión de clones al IL22R1 de ratón. Se desarrolló un nuevo enfoque basado en resonancia de plasmón superficial (RPS), lo que permitió analizar la competición de ligandos, la afinidad por ser humano y la reactividad cruzada con ratón en un cribado.

Los diferentes canales de un chip de Biacore (CM5) se recubrieron con:

- 10 1. Nada (Blanco)
2. IL-22 (3000 UR) para probar la actividad competitiva del Fab (cuando se coinyecta IL22R)
3. IL22R humano (3000 UR) para probar la unión a la diana
4. IL22R de ratón (2500 UR) para probar la reactividad cruzada

15 Para probar la competición de ligandos, se premezcló una baja concentración de IL22R1 soluble (0,2 µg/ml) con los extractos periplásmicos antes de la inyección. De esta manera, fue también posible medir la capacidad del Fab para bloquear la interacción ligando-receptor en el canal 2. Los extractos periplásmicos obtenidos se criaron en cuanto a su unión a IL22R humano (canal 3) e IL22R de ratón (canal 4).

20 La ventaja de este método en comparación con el ELISA convencional (de unión o competitivo) es que se prueban varias características del Fab al mismo tiempo: 1) unión al IL-22R humano diana; 2) actividad competitiva; y 3) reactividad cruzada. Adicionalmente, la medida de las constantes de disociación da un fuerte indicio de la afinidad de los Fab probados.

25 Utilizando este método de cribado alternativo, los Fab con todas las características posibles se identificaron y categorizaron basándose en su constante de disociación:

- 30 • Competitivo o no competitivo
- Reactivo de forma cruzada y no reactivo de forma cruzada
- Competitivo y reactivo de forma cruzada
- No competitivo y reactivo de forma cruzada

35 A continuación, se enviaron diversos clones para su secuenciación.

Ejemplo 4 Análisis de secuencia de los Fab para IL-22R

Los clones identificados por el análisis de Biacore (por ejemplo, competición de ligandos, máxima unión, baja constante de disociación o reactividad de forma cruzada con ratón) se secuenciaron. A continuación, los clones se agruparon basándose en su identidad de CDR3 para formar familias de VH.

40 En total, se identificaron 67 VH distintos pertenecientes a 13 familias de VH distintas. Se identificaron muchas más familias de cadenas ligeras (más de 80 secuencias de Vlambda y Vkappa). La gran diversidad en la secuencia y función de los Fab muestra que la inmunización y la selección fueron muy satisfactorias.

45 Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de los clones de interés particular se muestran a continuación en las Tablas 6 - 8, y las secuencias polinucleotídicas de estos clones se muestran en la Tabla 9.

Tabla 6 Secuencias de regiones marco conservadas y CDR para dominios VH de los Fab para IL-22R

Clon	FR1	SEQ ID NO.	CDR1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.	FR4	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.
157A2	QVQLVE SGGGLV QPGGSL RLSCAA SGFTFS	1	SYDM S	2	WVRQA PGKGL EWVS	3	SIYNDG SNTAY SDSVK G	4	RFTISRDNAKVN TLYLOQMNSLKS EDTAVYYCAK	5	VGFSGT YYSES	6	WGQGT TQVTV SS	7	
166G8	QVQLVE SGGGLV QPGDLS RLSCAA SGFTFG	8	SYFM S	9	WVRQA PGKGP EWVS	10	GIHISG GITYYL DSVKG	11	RFTISRDNAKVN TLYLOQMNNLKP EDTAVYYCVT	12	PPGPFK AHYNGM KY	13	WGKGT LVTVSS	14	

Tabla 7 Secuencias de regiones marco conservadas y CDR para dominios VL de los Fab para IL-22R

Clon	FR1	SEQ ID NO.	CDR1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.	FR4	SEQ ID NO.
157A2	NFMLTQ PSAVSV SLGQTA KITC	15	QGGY YAH	16	WYQQK PGQAP VLVIY	17	GNNNR PS	18	NTATLTISGAQ AEDEAEYYC	19	QSGSSS ANAV	20	FGGGT HLTVL	21
166G8	NFMLTQ PPSVSG TLGKTVT ISC	22	TGTS RDIG DYN VS	23	WYQQL PGLAP KLLIY	24	KVNTR SS	25	NTASLTISGLQ SEDEADYYC	26	ASYRLY ADYV	27	FGGGT HLTVL	28

Tabla 8 Secuencias de dominio variable para los Fab para IL-22R

Clon	VH	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.
157A2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWWSSYYNDGSNTAYSDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNLKSEDTAVYYCAKVGFSGTYYSESWGQGTQVTVSS	29	NFMLTQPSAVSVSLGQTAKITCQGGYYAHWYQQKPGQAPVLVIYGNNNRPSGIPERFSGSSGINTATLTSQAQAEDEAEYYCQSQQSSSANAVFGGGTHLTVL	30
166G8	QVQLVESGGGLVQPGDSURLSCAASGFTFGSYFMSWVRQAPGKGPFW/SGIHISGGITYYLDHSVKGRTISRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAVYYCVTPPGPFKAHYNGMKYWGKGTLVTVSS	31	NFMLTQPPSVSGTTLGKTVTISCTGTSRDIGDNYVSWYQQLPGLAPKLIIYKVNTRSSGTPDRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCASYRLYADYVFGGGTHLTVL	32

Tabla 9 Secuencias polinucleotídicas para los Fab para IL-22R

Clon	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
157A2	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGAGGGCTTGGT GCAGGCCCTGGGGTTCTCTGAGACTCTCCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTCAGTAGCTACGACATGAGCTGG GTCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGT GTCAGTATTATAATGACGGTAGTAACACAGCCTATT CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCCATCTCCAGAG ACAACGCCAAGAACACGTTGTATCTGCAAATGAACAG CTTGAATCTGAGGACACAGGCCGTATTACTGTGCA AAAGTTGGCTTATGTGGTACTTACACAGTGAATCAT GGGCCAGGGGACCCAGGTCAACCGTGTCTCA	52	AATTTTATGGCTGACTCAGGCCCTCCGGGTGTCCG TGCTTTGGACAGACGGCCAAGATCACCTGCC AAGGGGCTATTATGCTCACTGGTACCTGGTACATCTATG AGCCAGGCCAGGGCCCTGTGTTGGTCATCTATG GAAATAATAATAGGCCCTCAGGATCCCTGAGC GCTTCTGTGGTCCAGTGGGAACACAGCCA CCCTGACCATCAGCGGGCCAGGCTGAGGAC GAGGCCGAGTATTACTGTCACTGGAAAGCAGT AGTGCTAATGCTGTGTTGGGGAGGGACCCAT CTG ACGGTCTCG	73		
166G8	CAGGTGCAGCTGGAGTCTGGGGAGGGCTTGGT GCAGGCCCTGGGGATTCTCTGAGACTCTCCCTGTGCAGC CTCTGGATTCACTTCGGAAAGCTATTCTAGAGCTGG GTCGCCAGGCTCCAGGAAGGGCCGAGTGGGT CTCAGGTATTCAATTAGTGGTATTACATACTACT TAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG ACAACGCCAAGAACACAGCTGATCTGAAATGAACAA CCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTATTATTGTGA ACACCCCCGGCCCTTAAGGCCATTACAATGGC ATGAAGTACTGGGCAAGGGACCCCTGGTACCGTCA TCCTCA	74	AATTTTATGGCTGACTCAGGCCCTCCGGGTGTCTG GAACCTGGAAAAGACGGGTCAACCATCTCCCTGCA CTGGAAACAGTCGTGACATTGGGACTATAACTA TGTCCTCTGTATCAACAGCTCCAGGATTGGCC CCAAACTCTGTATATAAGTCAACACTCGAT CCTCAGGGACCCCTGATCGCTTCTGGCTCCA AGTCAGGGACACGGCCTCCCTGACCATCTCTG GGCTCCAGTCTGAGGACAGGGCTGATTATTACT GTGCCTCATATAGACTGTACGCCGATTATGTGTT CGGGGGAGGGACCCATCTGACCGTCTG	75		

Ejemplo 5 Caracterización de Fabs

Los clones con las mejores constantes de disociación se reclonaron en pCB4, se expresaron y purificaron por IMAC (Talon de Clonentech). Estos clones se probaron de nuevo utilizando Biacore. Los resultados de la caracterización de Fab adicional se muestran a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10 Caracterización de los Fabs de unión a IL-22R

Familia de VH	Clon	Unión a IL-22R humano	Unión a IL-22R de ratón	Bloqueo de IL-22	Constante de disociación (s^{-1})
1	170B2	Sí	Sí*	Sí	3,5E-04
1	170D6	Sí	Sí*	Sí	5,8E-03
1	160C8	Sí	No	Sí	3,2E-03
2	160C2	Sí	Sí	No	1,7E-03
3	158C4	Sí	Sí	No	6,7E-03
4	157A2	Sí	No	Sí	3,7E-03
4	171F4	Sí	No	Sí	5,9E-03
4	171A1	Sí	No	Sí	4,1E-03
4	171B1	Sí	No	Sí	1,9E-03
4	171C1	Sí	No	Sí	3,5E-03
5	159B8	Sí	No	Sí	1,5E-03
5	166G8	Sí	No	Sí	8,8E-04
5	169C1	Sí	No	Sí	3,2E-04
5	169H7	Sí	No	Sí	4,7E-04
5	169C8	Sí	No	Sí	4,3E-04
5	169H10	Sí	No	Sí	6,5E-04
5	171F10	Sí	No	Sí	1,2E-03
6	157C8	Sí	Sí	Sí	4,3E-03
6	157G8	Sí	Sí	Sí	8,6E-04
6	171A8	Sí	Sí	Sí	4,8E-03
7	157B8	Sí	No	No	7,7E-04
8	158H4	Sí	No	No	2,9E-03
11	165B8	Sí	Sí	No	9,7E-04
19	169G4	Sí	-	No	7,3E-04
20	172C9	Sí	Sí	No	6,1E-04
22	166D8	Sí	No	No	3,8E-03

(*) observado solo una vez con Fab purificado (no peri. o mAb), lo que sugiere una afinidad muy baja

10 Dependiendo de la diversidad en la familia de VH, la actividad de competición y la afinidad (medida utilizando la k_{off} obtenida en el Biacore) se seleccionaron uno o varios clones de cada familia y se reformatearon en anticuerpos monoclonales (mAb) para su caracterización adicional.

Ejemplo 6 Caracterización de los mAb de unión a IL-22R

15 Como se señaló anteriormente, se produjeron clones selectivos de cada familia de VH como IgG1. Después de reclonar las regiones variables de HC y LC en vectores de expresión pUPE separados que contenían los dominios constantes humanos, se transfecaron transitoriamente HEK293E con los dos plásmidos, uno que codifica la cadena pesada completa y un segundo que codifica la cadena ligera. Se permitió que las células transfectadas expresaran los anticuerpos durante un período del cultivo celular de 6 días. Después de la purificación de anticuerpos a partir del sobrenadante del cultivo celular utilizando perlas de proteína A, se probó la capacidad de los anticuerpos purificados para neutralizar la señalización de IL22R humano y de ratón utilizando distintas líneas celulares como se describe a continuación.

- 25 - Línea celular BW-hIL22R: Se obtuvo de la línea celular BW y tiene una expresión estable de IL22R humano, lo que introduce la detención del crecimiento dependiente de IL22. Por lo tanto, las células proliferarán solo cuando se bloquee la interacción IL22-IL22R. Un anticuerpo potente propiciará la proliferación a concentraciones bajas

de anticuerpo. La proliferación se mide mediante la incorporación de timidina.

- Línea celular Baf3-mIL22R: Obtenida de la línea celular Baf3 y tiene una expresión estable de IL22R de ratón que da lugar a una proliferación dependiente de IL22. El anticuerpo que neutraliza el mIL22R (forma siglada de mouse IL22R, IL22R de ratón) bloqueará la proliferación de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo.
 - Línea celular Baf3-hIL22R/IL20Rb: Se obtuvo de la línea celular Baf3, pero coexpresa hIL22R (forma siglada de human IL22R, IL22R humano) con hIL20Rbeta, permitiendo que las células proliferen en presencia de IL20. El anticuerpo que neutraliza el hIL22R bloqueará la proliferación de células estimuladas con IL20.
- 10 Los resultados del análisis de diversos mAb para IL22R contra la línea celular BW-hIL22R y la línea celular Baf3-hIL22R/IL20Rb se muestran en la Figura 4 y la Tabla 11. En la Fig. 4A, se pueden observar los efectos de los anticuerpos neutralizantes de IL22R en la restauración de la proliferación de la línea celular BW-hIL22R. En la figura 4B se pueden ver los efectos de los anticuerpos neutralizantes de IL22R en la inhibición de la proliferación con IL-20 de la línea celular que expresa IL-22R. El anticuerpo IL22R descrito en el documento WO2011/061119 (280.346.TSY) se incluyó en los experimentos como un anticuerpo para IL-22R de referencia o de comparación.
- 15 Además de la potencia en las células, se midieron en Biacore (3000) la cinética de la unión *in vitro* y la actividad de bloqueo de los anticuerpos purificados. Para medir la afinidad, se recubrió IL22R recombinante sobre un chip Biacore CM5 a 200 UR utilizando un protocolo de recubrimiento convencional (se inyecta IL22R a 10 µg/ml en tampón acetato pH 4,5). Los anticuerpos probados en un intervalo de concentraciones y preparados en tampón HBSEP a pH 7,4 (Biacore) se inyectaron a 30 µl/min durante 60 segundos y se lavaron con tampón HBSEP a pH 7,4 (Biacore) durante 10-20 min. Los sensogramas obtenidos se analizaron con el programa informático BIAevaluation y la cinética se determinó utilizando un ajuste convencional (Langmuir 1:1 con transferencia de masa).
- 20 Para la actividad de bloqueo utilizando Biacore 3000, se recubrió IL22 recombinante (RnD System) a 2000 UR sobre un chip CM5. Los dominios de unión a antígeno (IgG purificada, Fab purificados o extracto periplásmico que contiene los Fab) se preincubarón con IL22R humano recombinante (concentración entre 0,2 y 1 µg) antes de la inyección en el canal recubierto de hIL22. La detección de la unión (IL22R:hIL22) indicó que el dominio de unión a antígeno no competía mientras que cuando no se detectaba unión (IL22R:IL22), esto indicaba que el dominio de unión a antígeno estaba bloqueando la interacción IL22:IL22R *in vitro*. Los resultados de los ensayos de Biacore y de proliferación se resumen a continuación en la Tabla 11.
- 25
- 30

Tabla 11 Sumario de las características de un panel de anticuerpos para hIL22R

Familia de VH	Clon	Unión a hIL22R en Biacore			Biacore	CI50 (pM) de potencia en el ensayo de proliferación	BW IL22R humano	BaF3 IL22R de ratón
		Ka (1/Ms)	Kd (1/s) (constante de disociación)	KD (M)				
1	170B2	7,6E+05	9,3E-05	1,2E-10	Sí	60-200*	-	
1	170D6		2,2E-04		Sí	3.830	-	
2	160E2		6E-05		No	-	1.406	
3	158C4		6E-04		No	-	-	
4	157A2	3,9E+05	1,1E-03	2,8E-09	Sí	80-130*	-	
4	171A1		7,4E-04			3.320		
5	159B8		2E-03		Sí	100-200*	-	
5	166G8	9,2E+06	2,0E-04	2,2E-11	Sí	10-50*	-	
5	169C1				Sí	35-90*	(-)	
6	157G8		5,4E-05		Sí	1.174/ 2.090	-	
7	157B8		3,4E-05		No	19.000	38.000	
8	158H4		3E-05		No	500-1.600*	5-20x10 ³ *	
11	165B8		3,1E-06		No	-	-	
19	169G4	5,4E+05	3,1E-03	5,7E-09	No	1.489		
20	172C9				No	-	-	
22	166D8		3,2E-03		No	74.000	-	
Referencia	280.346.TSY	2,7E+05	6,4E-05	2,4E-10	Sí	20-110*	10-50*	

(continuación)

		Unión a hIL22R en Biacore			Bloqueo de IL22-IL22R	CI50 (pM) de potencia en el ensayo de proliferación	
Familia de VH	Clon	Ka (1/Ms)	Kd (1/s) (constante de disociación)	KD (M)	Biacore	BW IL22R humano	BaF3 IL22R de ratón
*Intervalo observado en varios experimentos							

Los anticuerpos para IL22R 157A2 y 166G8 presentan una potencia en el orden de picomolar.

5 Ejemplo 7 Reactividad cruzada de especies de los mAb para IL-22R

Se probaron los mAb para IL22R en cuanto a la reactividad cruzada de especies contra IL-22R murino e IL-22R de primate no humano.

10 El ADNc para IL22R de cinomolgo no estaba disponible y se tuvo que extraer de bibliotecas de ADNc de cinomolgo. Los cebadores se diseñaron basándose en la base de datos pública del NCBI. Varias secuencias para el ECD (forma silgada de *extracellular domain*, dominio extracelular) de cynoIL22R (forma siglada de *cynomolgus IL22R*, IL2R de mono cinomolgo) estaban disponibles en bases de datos públicas (Genbank, NCBI) y contenían inserción, eliminación o ambas (véase la Figura 5). La incertidumbre con respecto a la verdadera secuencia de IL22R de cinomolgo justificó la clonación a partir de ADNc de cinomolgo.

15 El ECD de IL22R de cinomolgo se amplificó mediante PCR a partir de una biblioteca de ADNc y se clonó en marco cadena abajo del péptido señal IgGkappa y cadena arriba del Fc humano en el vector pUPE. Aunque el ADNc utilizado se obtuvo de cinomolgo, la secuenciación de varios clones mostró que también se había clonado el IL22R de rhesus. El ECD de IL22R de rhesus se caracterizó por la ausencia de la delección e inserción encontradas en cinomolgo (recuadrado en la Figura 5) y por diferencias de 2 aminoácidos entre IL22R de rhesus y cinomolgo (en negrita en la Figura 5).

20 Después de la producción y purificación de cytIL22R-Fc y rhIL22R-Fc, la especificidad de unión al ECD de IL22R de cinomolgo, rhesus y ratón de todos los anticuerpos de la selección primaria se probó en ELISA y por RPS (Biacore). El IL22R de ratón monomérico se adquirió de R&D Systems (cat. 4248-MR). Los resultados se resumen en la Tabla 25. 12.

Tabla 12 Reactividad cruzada de especies de los mAb para IL-22R

Familia de VH	Clon	Unión a IL22R de:			
		ser humano	ratón	cino	rhesus
1	170B2	Sí	No	np	np
1	170D6	Sí	No	np	np
2	160E2	Sí	Moderada	Sí	Sí
3	158C4	Sí	No	Sí	Sí
4	157A2	Sí	No	Sí	Sí
5	159B8	Sí	No	No	Débil
5	166G8	Sí	No	No	Sí
5	169C1	Sí	No	No	Débil
6	157G8	Sí	Moderada	Sí	Moderada
7	157B8	Sí	No	Sí	Sí
8	158H4	Sí	Moderada	Sí	Sí
8	205A5	Sí	Moderada	Sí	Sí
11	165B8	Sí	Moderada	Moderada	Moderada
19	169G4	Sí	No	Sí	Sí
20	172C9	Sí	Moderada	Sí	Sí
22	166D8	Sí	No	Sí	Sí
Referencia	280.346.TSY	Sí	Sí	Sí	Sí

np = no probado

30

Ejemplo 8 Mapeo epítópico

Se emplearon dos métodos para identificar y comparar los epítopos a los que se unen los mAb para IL22R: ELISA

competitivo y FACS.

8.1 Mapeo epítópico utilizando ELISA competitivo

- 5 Los epítopos reconocidos por los anticuerpos se compararon entre sí mediante ELISA competitivo. Se revistió al menos un mAb representativo de cada familia de VH en una placa Maxisorp. Posteriormente, se añadió IL22R humano biotinilado en presencia de un gran exceso de mAb a probar. La unión de IL22R biotinilado al anticuerpo recubierto se detectó utilizando estreptavidina conjugada con HRP. Cuando no se detectaba IL22R biotinilado, lo que significaba que el mAb impedía la unión al mAb recubierto, se determinó que ambos mAb se unen al mismo epítopo o tienen un epítopo solapante. El mapeo epítópico se refinó aún más utilizando los Fab en lugar de los mAb. El fragmento Fab más pequeño permitió alguna distinción de epítopos muy cercanos.

10 Se identificaron una diversidad de epítopos para los anticuerpos de las familias de VH 1-8, 10, 11, 19 y 22. El mapeo epítópico muestra una cobertura de epítopos muy amplia para una proteína tan pequeña (25 kDa). Como se muestra en la Figura 6, los epítopos se agruparon de acuerdo a si los anticuerpos (i) bloquearon la unión de IL-22 *in vitro* y neutralizaron la señalización de IL-22 en un ensayo basado en células (cuadrante inferior izquierdo); (ii) bloquearon la unión de IL-22 *in vitro*, pero no tuvieron actividad neutralizante (cuadrante superior derecho); o (iii) no bloquearon la unión de IL-22 *in vitro*, pero tenían actividad neutralizante en un ensayo basado en células (cuadrante inferior derecho). Se descubrió que seis epítopos solapantes pero distinguibles bloquean y neutralizan (véase el cuadrante inferior izquierdo) y, de estos seis epítopos, dos (los mAb de la familia 4 y 22) tenían un epítopo solapante con el anticuerpo de referencia (280.346.TSY, véase la solicitud de patente WO2011/061119). El epítopo no era idéntico a la referencia ya que estos mAb (de la familia 4 y 22) pudieron competir también con todos los mAb de las familias 1, 5, 6 y 7 aunque estos no pudieron competir con el anticuerpo de referencia. Tomados en conjunto, estos datos sugieren 2 grupos de epítopos distintos, uno formado por la referencia y otro formado por los mAbs de las familias 1, 5, 6 y 7, y un tercer grupo (mAb de las fam. 4 y 22) que se solapan con ambos grupos (figura 6).

15 Como se muestra en el cuadrante superior derecho de la Figura 6, se identificaron 3 anticuerpos que se unen a IL22R pero que no bloquean la unión de IL22 ni neutralizan la actividad *in vivo*. Estos anticuerpos probablemente se unen a regiones de IL22R no implicadas en la unión del ligando o la activación de la señalización, y podrían utilizarse para detección pura. Los 3 anticuerpos mostrados en el cuadrante inferior derecho de la Figura 6 son inusuales porque neutralizan la actividad de IL22R *in vivo*, pero no bloquean a IL22 *in vitro*, lo que sugiere un nuevo epítopo funcional y un modo de acción inesperado.

8.2 Mapeo epítópico utilizando análisis de FACS

20 Jones *et al.* (Structure 16(9): 1333-1344 (2008)) informan sobre la estructura de IL-22 unida al dominio extracelular de IL22R1. En este trabajo, los autores muestran que los dos dominios de IL22R, llamados D1 y D2, interactúan con el ligando IL-22 en el sitio 1A y el sitio 1B, respectivamente (véase la Figura 7). Dos restos clave en IL22R-D1 implicados en la interacción directa con el sitio 1A de IL22 son la lisina 58 (K58) y la tirosina 60 (Y60). El triptófano 208 (W208) de IL22R-D2 está directamente implicado en la interacción con el sitio 1B de IL22 (véase la Figura 7).

25 Se probó la unión de anticuerpos para IL22R y del anticuerpo de referencia (280.346.TSY) a células BW que sobreexpresan diversos mutantes de IL22R. Los mutantes de IL22R tienen mutaciones de aminoácidos que se sabe que están implicados en la interacción IL-22/IL22R. En esta configuración, los anticuerpos se biotinilaron, se añadieron a las células y se detectó la unión del anticuerpo a IL22R con estreptavidina marcada mediante citometría de flujo (FACS). La tabla 13 resume los resultados obtenidos.

Tabla 13 Unión de anticuerpos a células que expresan mutantes de IL22R

mutantes de hIL-22R	Fam. de VH	A209 D	W208 A	T207 A	K58 A	Y60 A	R112 A	T89 A	E90 A	Q117 A	D162 A
Sitio de unión a IL22		1B	1B	1B	1A	1A	1A	1A	1A	1A/B	1B
AMR22		+	+	+	X	X	X	+	+	+	+
280.346.TSY		+	+	+	X	X	+	+	+	+	+
198A1	5	X	+	+	+	+	+	+	+	+	+
166G8	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
197B7	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
196F8	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
158H4	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
169G4	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ = unión; X= mutación en IL22R da como resultado la pérdida de unión del anticuerpo.

Los resultados de FAC muestran claramente que el anticuerpo de referencia 280.346.TSY interactúa con restos del dominio D1 (K58 e Y60). Lo mismo ocurre con un segundo anticuerpo para IL-22R de control, AMR22, aunque el epítopo no es completamente el mismo, ya que la mutación R112A afecta la unión de AMR22. Como se esperaba

- 5 Los datos probados por IL22R que muestran que determinadas anticuerpos se unen al dominio D2 de IL22R, los otros anticuerpos probados no se vieron afectados por las mutaciones que afectan la unión de 280.346.TSY a IL22R. Esto confirmó que los anticuerpos tienen como diana a otro epítopo, que incluye posiblemente restos en el dominio D2. De hecho, la mutación A209D en el dominio D2 de IL22R anuló la unión de 198A1, lo que confirma que 198A1 y el anticuerpo de la familia 5 se unen al dominio D2 de IL22R (véase la Figura 7B).

- 10 Sorprendentemente, el anticuerpo 166G8, que comparte exactamente el mismo VH que 198A1, pero tiene un VL distinto, no se ve afectado por la mutación A209D, lo que sugiere que el VL está involucrado en la interacción. Presumiblemente, el VL de 166G8 permite un gran resto en la posición 209, mientras que el VL de 198A1 no lo hace. Esta hipótesis se confirma por su especificidad de unión a IL22R de rhesus. En rhesus, IL22R tiene una serina en la posición 209. Dado que 166G8 permite un gran aminoácido en esa posición, puede unirse a IL22R de rhesus mientras que 198A1 no puede unirse a rIL22R ya que no permite restos grandes.

15

Ejemplo 9 Neutralización de la señalización de IL20 e IL24 en un ensayo basado en células

Se probó la capacidad de los anticuerpos para IL22R de bloquear la señalización dependiente de IL-20 e IL-24 en células que coexpresan IL22R e IL20Rb. Existe una diferencia de mecanismo entre la activación del receptor dependiente de IL-22, IL-20 e IL-24. Se cree que IL-22 induce la señalización al unirse primero a IL22R, desencadenando el reclutamiento del coreceptor IL10R2 y la activación del complejo trimérico. Para IL-20, se cree que esta citocina se une primero al coreceptor (IL20R2) antes de reclutar IL22R y de la activación del complejo trimérico. Finalmente, para IL-24, no está claro cómo se recluta y activa el complejo receptor, tampoco está claro dónde se une IL-24.

9.1 Señalización de IL-24

Se utilizaron varias líneas celulares para probar la señalización dependiente de IL-24, Baf3-hIL22R/20R2 o Baf3-mIL22R/20R2. IL-24 indujo la proliferación de estas líneas celulares con una ventana significativa según lo medido por el nivel de hexosaminidasa (lectura utilizada para contar las células) que varía de un DO de 0,17 a 1,5 para las células Baf3-hIL22R/20Rb y varía de 0,15 a 0,8 para las células Baf3-mIL22R/20Rb. Ninguno de los anticuerpos probados tuvo efecto sobre la proliferación inducida por IL-24. Estos resultados sugieren que IL-24 tiene un modo completamente distinto de activación de IL22R al unirse a un sitio muy distinto que IL22 e IL-20, o que IL22R no está implicado en la señalización de IL-24 en la línea celular probada (y el ensayo no predice la actividad neutralizante).

9.2 Señalización de IL-20

40 La línea Baf3-hIL22R/IL20R β se obtiene de la línea celular Baf3, pero coexpresa hIL22R con hIL20R β , lo que permite que las células proliferen en presencia de IL-20. El anticuerpo que neutraliza a hIL22R bloqueará la proliferación de células estimuladas con IL-20. Los resultados producidos al analizar los anticuerpos de llama junto con los anticuerpos de referencia 280.346.TSY y AMR22 se muestran en la Figura 8.

45 La proliferación por IL-20 en Baf3-hIL22R/IL20Rb se probó en paralelo con el ensayo de proliferación por IL-22 de BW-hIL22R, permitiendo una buena comparación entre las dos citocinas. En la Tabla 14 se muestran los resultados de hasta tres experimentos independientes.

Tabla 14 Potencia de los anticuerpos para bloquear la señalización de IL-22 e IL-20 a través de IL22R

	Familia de VH	CI50 de bloqueo de IL-22 (pM)	CI50 de bloqueo de IL-20 (pM)
166G8	5	6-84	160-170
198A1	5cs	10-80	85-140
197B7	1	61-370	1.600-6.960
157A2	4	131-540	184-545
218A7	4	360	np
158H4	8	1600	nc
205A5	8cs	500-1.200	nc
AMR22	Referencia	715-5.000	470 (n=1)
280.346.TSY	Referencia	22-250	280-800

*Intervalo observado en hasta tres experimentos (2250, 2292, 2301 para IL-20 y 2253, 2292, 2301, 2428 para IL-22); nc: no compite; np: no probado; cr: cadena reordenada

- 50 Se puede concluir que todos los anticuerpos de las familias n.^o 1, n.^o 4 y n.^o 5 pudieron bloquear tanto IL-20 como IL-

22. Es difícil comparar la potencia entre la proliferación estimulada por IL-22 e IL-20 debido a la diferencia de sensibilidad, que depende de la concentración de citocinas, del número de receptores y de la variación biológica intracelular. Sin embargo, se descubrió que la mayoría de los anticuerpos son más potentes para bloquear la señalización de IL-22 en comparación con el bloqueo de la de IL-20. La interesante excepción fue 157A2, que tiene la misma potencia para bloquear IL-22 e IL-20.

5

Ejemplo 10 Selección de anticuerpos destacados y modificaciones de estirpe germinal

La afinidad de los anticuerpos más interesantes (que neutralizan la señalización de IL22) se mejoró adicionalmente mediante el reordenamiento de cadenas ligeras. Durante el reordenamiento de cadenas ligeras, el VHCH1 del anticuerpo seleccionado se combina con la biblioteca de cadenas ligeras de la misma llama en la que se encontró el VHCH. A continuación, se realizan varias rondas de selección de presentación de fagos de constante de disociación para identificar las parejas VHCH:VLCL que tienen la mejor afinidad. En el caso del anticuerpo 166G8, se encontraron varios clones con cinética de unión mejorada, incluido 198A1, pero, desafortunadamente, este clon perdió la mayor parte de su reactividad cruzada con rhesus y, por lo tanto, 166G8 siguió siendo el candidato más atractivo de la familia n.º 5 para el desarrollo. En el caso de 157A2 (de la familia n.º 4), se identificaron varios Fab (por ejemplo, 218A7) con una afinidad mejorada en comparación con 157A2. Los siguientes anticuerpos se han escogido para un desarrollo posterior. Estos anticuerpos se seleccionaron en función de su potencia, su reactividad cruzada con especies y su epítopo o su modo de acción.

- 10
- **218A7** (una variante mejorada de **157A2**, familia n.º 4) - se descubrió que este anticuerpo tiene muy buena potencia contra IL-22 e IL-20 (subnM), tiene reactividad cruzada con IL22R de primate no humano, pero no tiene reactividad cruzada con IL22R murino. Se descubrió que 157A2 tiene un epítopo en IL22R distinto pero solapante con el anticuerpo de referencia 280.346.TSY.

15

 - **166G8** (familia n.º 5) - se descubrió que este anticuerpo tiene alta potencia (bajo pM) y tiene reactividad cruzada con algunas especies, ya que se une a IL22R de rhesus (pero no a IL22R de cinomolgo ni al murino).

20 Las características de los anticuerpos para IL22R escogidos se resumen a continuación en la Tabla 15.

25

30 **Tabla 15 Características de los anticuerpos para IL22R de llama seleccionados para modificaciones de estirpe germinal**

	Familia de VH	Reactividad cruzada				Potencia		Epítopo
		h	cino	rh	r	IL-22 (pM)	IL-20 (pM)	
157A2	4	+++	+++	+++	-	131-570	184-545	1,09
218A7	4	+++	+++	+++	-	350-360	nd	-
166G8	5	+++	-	++	-	6-84	160-170	3,67
280.346.TSY		+++	+++	+++	+++	22-250	280-800	7,5

h = humano; cino = cinomolgo; rh = rhesus; r = ratón

Ejemplo 11 Modificaciones de estirpe germinal de los anticuerpos para IL-22R 218A7 y 166G8

35 Las modificaciones de estirpe germinal se llevaron a cabo como se describe en la solicitud de patente internacional n.º WO2011/080350, cuyo contenido se incorpora en el presente documento en su totalidad. Las CDR se mutaron para eliminar posibles modificaciones postraduccionales junto con determinadas otras posiciones, que se descubrió que varían en anticuerpos de las mismas familias de VH y VL con emparejamiento idéntico. Se evaluó la identidad de los dominios VH y VL de los anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal producidos a partir de los anticuerpos de llama 218A7 y 166G8 con las secuencias humanas. También se realizó una comparación con el anticuerpo de referencia 280.346.TSY. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 16.

40 **Tabla 16 Identidad humana de anticuerpos para IL-22R con modificaciones de estirpe germinal producidos a partir de 218A7 y 166G8**

	Nombre del clon	% de identidad para VH	% de identidad para VL	% de identidad para VH+VL	Constante de disociación para IL-22R1 humano*	Constante de disociación para IL-22R1 de rhesus*
	166G8	88,5	84,8	86,7	1,22E-0,3	2,22E-02
22	224C7	93,1	93,7	93,4	4,19E-04	2,20E-02
6	224C6	94,3	93,7	94,0	4,34E-04	1,85E-02
21	224A6	93,1	93,7	93,4	4,41E-04	4,68E-0,3
14	224C4	92,0	94,9	93,5	4,50E-04	4,51E-0,3

(continuación)

	Nombre del clon	% de identidad para VH	% de identidad para VL	% de identidad para VH+VL	Constante de disociación para IL-22R1 humano*	Constante de disociación para IL-22R1 de rhesus*
16	224G10	92,0	94,9	93,5	4,71E-04	3,75E-0,3
15	224E8	92,0	94,9	93,5	4,81E-04	4,51E-0,3
1	223G5	93,1	97,4	95,3	5,29E-04	5,84E-0,3
20	223D3	93,1	93,7	93,4	5,73E-04	2,01E-0,3
2	223C4	94,3	96,2	95,3	5,74E-04	6,27E-0,3
11	223A6	90,8	96,2	93,5	5,79E-04	2,58E-0,3
13	223G1	92,0	94,9	93,5	5,96E-04	5,05E-0,3
8	226B9	95,4	92,4	93,9	7,14E-04	4,65E-0,3
3	225A5	93,1	96,2	94,7	1,14E-0,3	1,55E-02
5	227C5	93,1	94,9	94,0	1,25E-0,3	4,98E-0,3
17	227G10	92,0	94,9	93,5	1,25E-0,3	2,73E-0,3
19	225G7	92,0	94,9	93,5	1,29E-0,3	4,27E-0,3
18	225E5	92,0	94,9	93,5	1,35E-0,3	1,67E-0,3
12	225A4	90,8	96,2	93,5	1,42E-0,3	4,21E-0,3
9	225A10	95,4	92,4	93,9	1,55E-0,3	1,07E-02
7	225D8	94,3	93,7	94,0	1,64E-0,3	5,11E-0,3
23	225G4	93,1	93,7	93,4	1,74E-0,3	3,75E-0,3
10	225C6	95,3	92,4	93,9	1,76E-0,3	2,63E-0,3
4	225B2	94,3	94,9	94,6	2,78E-0,3	4,55E-0,3
	218A7	95,4	91,1	95,4	8,10E-04	9,70E-04
13	230C9	100	96,2	98,1	3,52E-04	4,36E-04
10	230B7	98,9	97,5	98,2	3,77E-04	8,17E-04
19	229B4	98,9	96,2	97,6	3,81E-04	4,79E-04
1	230H2	100	98,7	99,4	4,01E-04	1,08E-0,3
18	228F9	97,7	97,5	97,6	4,01E-04	4,34E-04
14	228C9	100	96,2	98,1	4,08E-04	4,72E-04
12	232G6	100	96,2	98,1	4,14E-04	1,27E-0,3
11	232F5	100	96,2	98,1	4,24E-04	1,27E-0,3
5	231C11	98,9	97,5	98,2	4,30E-04	1,32E-0,3
6	231E12	98,9	97,5	98,2	4,35E-04	1,33E-0,3
3	228F3	97,7	98,7	98,2	4,39E-04	1,25E-0,3
2	230D5	98,9	98,7	98,8	4,45E-04	1,32E-0,3
4	231B11	98,9	97,5	98,2	4,55E-04	1,32E-0,3
8	229E6	98,9	97,5	98,2	4,59E-04	5,41E-04
20	229D9	100	94,9	97,5	4,69E-04	6,84E-04
16	229G1	97,7	97,5	97,6	4,77E-04	5,08E-0,3
7	231F12	98,9	97,5	98,2	5,30E-04	1,35E-0,3
17	228A4	97,7	97,5	97,6	5,95E-04	1,97E-0,3
15	231A8	97,7	97,5	97,6	1,48E-0,3	2,85E-0,3
9	229G2	98,9	97,5	98,2	1,86E-0,3	3,30E-0,3
	280.346.TSY	88,5 %	100 %	94,3 %	-	-

*Determinada para fragmentos Fab

El anticuerpo **230C9** se seleccionó como una variante con modificaciones de estirpe germinal del anticuerpo 218A7, y el anticuerpo **223G5** se seleccionó como una variante con modificaciones de estirpe germinal del anticuerpo 166G8. Las secuencias de los dominios VH y VL de los anticuerpos 218A7, 230C9 y 223G5 se muestran a continuación en las Tablas 17-21. (Las secuencias de 166G8 se muestran en las Tablas 6-9 anteriores.)

Tabla 17 Secuencias de regiones marco conservadas y CDR para dominios VH de 218A7, 230C9 y 223G5

Clon	FR1	SEQ ID NO.	CDR1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.	FR4	SEQ ID NO.	SEQ ID NO.
218A7	QVQLVE	1	SYDM	2	WVRQA	3	SIYNDG	4	RFTISRDNAKN	5	VGFSGT	6	WGQG	TQVTVS	7
	SGGGLV		S		PGKGL		SNTAY		TLYLQMNSLKS		YYSES				
	QPGGSL				EWVVS		SDSVK		EDTAVYYCAK						
	RLSCAA						G								
230C9	QVQLVE	33	SYDM	34	WVRQA	35	SIYNDA	36	RFTISRDNSKN	37	VGFSGT	6	WGQG	TLVTVS	38
	SGGGLV		N		PGKGL		SNTAY		TLYLQMNSLRA		YYSES				
	QPGGSL				EWVVS		SDSVK		EDTAVYYCAK						
	RLSCAA						G								
	SGFTFS														
223G5	QVQLVE	39	SYFM	9	WVRQA	40	GIHISG	41	RFTISRDNAKN	42	PPGPFK	43	WGKGT	LVTVSS	44
	SGGGLV		S		PGKGP		GITYT		TLYLQMNSLRA		AHYNGA				
	QPGGSL				EWVVS		DSVKG		EDTAVYYCVT		KY				
	RLSCAA														
	SGFTFS														

Tabla 18 Secuencias de regiones marco conservadas y CDR para dominios VL de 218A7, 230C9 y 223G5

Clon	FR1	SEQ ID NO.	CDR1	SEQ ID NO.	FR2	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	FR3	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.	FR4	SEQ ID NO.
218A7	LPVLTQP SAVSVSL GQTARIT C	45	QGGY YAH	16	WYQQK PGQAP VLVIY	46	GQNNR PS	47	NTATLTISGAQ AEDEAEYYC	48	QSGSSS ANAV	20	FGGGT KLTVL	49
230C9	SYELTQ PSSVSV ALGQTA RTIC	50	QGGY YAH	16	WYQQK PGQAP VLVIY	51	GQNNR PS	47	NTATLTISRAQ AEDEADYYC	53	QSGSSS SNAV	54	FGGGT KLTVL	55
223G5	QSALTQ PPSVSG SPGQSV TISC	56	TGTS SDIGS YNVV S	57	WYQQL PGKAP KLLIY	58	EVNKR SS	59	NTASLTISGLQ AEDEADYYC	60	ASYRLY ADYV	27	FGGGT QLTVL	61

Tabla 19 Secuencias de dominio variable para 218A7, 230C9, 223G5

Clon	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
218A7	QVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWV RQAPGKGLEWVSSYNDGSNTAYSDSVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKVGFSGTYYSESWGQ GTQVTVSS	29		LPVLTQPSAVSVSLGQTARITCQQGYAAHWYQQK PGQAPVLVIYQQNRPMSGIPERFSGSGAGNTATLTI SGAQAEDEAEYYCQSGSSSANAVFGGGTKLTVL		62
230C9	QVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTFSSYDMNWV RQAPGKGLEWVSSYNDASNTAYSDSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVGFSGTYYSESWGQ GTLVTVSS	63		SYELTQPSSSVSVALGQTARITCQQGYAAHWYQQK PGQAPVLVIYQQNRPMSGIPERFSGSGAGNTATLTI SRAQAEDEADYYCQSGSSSANAVFGGGTKLTVL		64
223G5	QVQLVESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTFSSYFMSWV RQAPGKGPEWVSGIHISGGITYTDSVKGRFTISRDNAK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCUTPPGPFKAHNGAKYW GKGTIVTVSS	65		QSALTQPPSVSGSPGQSVTISCTGTSSD I GSYNYV SWYQQLPGKAPKLLIYEVNKRSSGVPDRFSGSKS GNTASLTISGLQAEDADYYCASYRLYADYVFGGG TQLTVL		66

Tabla 20 Secuencias de cadena pesada y cadena ligera para 230C9 y 223G5

Clon	Cadena pesada	SEQ ID NO.	Cadena ligera	SEQ ID NO.
230C9	QVQLVESGGGLVQPFGSSLRLSCAASGFTFSSYDMNWVRQAPGKGLEW/VSSIYNDASNTAYSDSVKGRFTISRDNSKNTLYQMNSSLRAEDTAVYYCAKVGFSGTYYESWQQGTLVTSSASTKGPSVFFPLAPSSKSSTSGGTAAALGCLVKDYEPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTRPEVTCVVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYQSTYRVSILTVLHQDWLNGKEYKCKWSNKALPAPIEKTIASKKGQPREPQYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA/EWESENQOPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	67	SYELTQPSSVSVSVALGQTARITCQGGYYAHWYQQKPGQAPVLUVYQNNNRPSGIPERFSGSGAGNTATLTSRAQAEDEADEADYYCQSSSSNAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAQDSSPVKAGVETTTPSKQSNMKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	68
223G5	QVQLVESGGGLVQPFGSSLRLSCAASGFTFSSYFMSWVRQAPGKGPENVSGIHSGGITYYTDV/KGRFTISRDNAKNLYQMNSSLRAEDTAVYYCVTPGPFKAHYNGAKYWGGTGLTVSSASTKGPSVFFPLAPSSKSSTSGGTAAALGCLVKDYEPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTRPEVTCVVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYQSTYRVSILTVLHQDWLNGKEYKCKWSNKALPAPIEKTIASKKGQPREPQYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA/EWESENQOPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	69	QSLTQPPSVSGSPGQSVTISCTGTSSDGSYNYVSWYQQLPGKAPKLLIYEVNKRSSGVPDFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCASYRLYADYVFGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAQDSSPVKAGVETTTPSKQSNMKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	70

ES 2 903 412 T3

Las porciones sombreadas de la secuencia representan las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera. El resto "Q" que se muestra en negrita en la región constante de la cadena pesada representa una mutación de "N".

Tabla 21 Secuencias polinucleotídicas que codifican las secuencias de dominio variable/secuencias de cadena pesada y cadena ligera para 218A7, 230C9 y 223G5

Clon	Dominio VH	SEQ ID NO.	Dominio VL	SEQ ID NO.
218A7	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGTGCAGC CTGGGGTTCTCTGAGACTCTCTGTGAGCCTCTGGATTCA CCTCAGTAGCTACGACATGAGCTGGTCCAGTATTATAATGACG GGAAAGGGGCTGGAGTGGTCCAGTATTATAATGACG GTAGTAACACAGCCTATTCCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTG ACCATCTCCAGAGAACAGCCAAAGAACACGTTGTATTACTG ATGAAACAGCTTGAATCTGAGGACACGGCGTGTATTACTG TGCAAAGTTGGCTTATGGTACTTACTACAGTGAATCATG GGCCAGGGGACCCAGGTACCGTGCCTCA	76	CTGCTCTGTGCTGACTCAGGCCCTCGGGGTGTCCTGGTCT TGGACAGACGGCCAGGATCACCTGCCAAGGGGCT ATTATGCTCACTGGTACCTATGGACAGAATAATGGCCCTC CCTGTCGCTGGTCATCTATGGACAGAATAATGGCCCTC AGGGATCCCTGAGCGCTTCTCTGGCTCGGGCTGGTGG ACACAGCCACCTGACCATCAGGGGGCCAGGCTGA GGACGAGGCTGAGTATTACTGTCACTGAGAAGCAGT AGTGTAAATGCTGTGTTGGGGAGGGACCAAGCTGA CCGTCTC	77
230C9	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGT GCAGGCTGGGGTTCTCTGAGACTCTCTGTGCTGC CTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACGACATGAACCTGG GTCGCCAGGCTCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGT GTCCAGCATTATAACGACGCCAGTAACACGCCAT TCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACCATTCTCCAGA GACAACCTAAAGAACACGTTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCTGAGGACACGGGCCGTTATTACTGTG CGAAAGTTGGCTTATGGTACTTACTACAGTGAATC ATGGGGCCAGGGGACCCCTCGTCACTGTCCTCA	78	TCCTACGAAACTGACTCAGGCCCTCGGGTGTCC GTGGCGTTGGGACAGACGGCCAGGATCACCTGC CAAGGAGGCTTATTATGACACTGGTACCGAGCAG AAGCCAGGCCAGGGCCCTGTGCTGGTCATCTAT GGACAGAATAATAGGCCCTCAGGGATCCCTGAG CGCTTCTCTGGCTCCGGCGCCAGGCTGAGGAC ACCCGTGACAATTAGCCGGCCAGGCTGAGGAC GAGGCTGACTTATTACTGTCACTGAGAAGCAGTA GTTCTAATGCTGTGTTGGGGAGGGACCAAGC TGACCGTCCCTC	79
223G5	CAGGTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGAGGGCTGGT GCAGGCTGGGATCTCTGAGACTCTCTGTGAGC CTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATTCTATGAGCTGG GTCGCCAGGCTCAGGAAGGGGCCGAGTGGGT CTCAGGTATTCAATTAGTGTGGTATTACATACTACA CGGACTCCGTGAAGGGGCCGATTCAACATCTCCAGAG ACAAACGCAAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAG CCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTTATTATGTGTA ACACCCCCGGCCCCCTTAAGGGCCATTACAATGGC GCGAAGTACTGGGAAAGGGACCCCTGGTCACTGTC TCCTCA	80	CAGTCTGGCCCTGACTCAGGCCCTCGTGTGGATCT CCTGAGACTGTCACCATCTCTCTGACTGGAAACAGT AGTGACATTGGTCTATAACTATGTCCTCCCTGATCTCAA CAGCTCCAGGAAAGGCCAAACTCTGATCTATGA GGTCACAAAGGATCCTAGGGTCCCTGATGCTTCT CTGGCTCCAAGTCAGGCAACACGGCTCCCTGACCAC TCTGGCTCCAGGCTGAGGACGGCTGATTATTACTG TGCCCTCATATAGACTGTACGCCGATTATGTTGGCG GAGGGACCCAACTGACCGTCCCT	81

Ejemplo 12 Caracterización de los anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal 230C9 y 223G5**12.1 Afinidad de unión de los mAb con modificaciones de estirpe germinal**

- 5 La afinidad de los anticuerpos 230C9 y 223G5 se midió utilizando RPS (Biacore 300). En resumen, se recubrieron 250 UR de IL22R humano (Biotechne, 2770-LR) sobre un chip CM5 utilizando métodos convencionales (acoplamiento de EDC de IL22R a una concentración de 2 µg/ml en tampón acetato pH 4,5). A continuación, se inyectaron diversas concentraciones de anticuerpo en tampón HBSEP+ (pH 7,4) durante 2 minutos. La unión también se controló durante un lavado de 10 min (HBSEP+).
- 10 Las afinidades calculadas utilizando el programa informático BIAevaluation utilizando un ajuste Langmuir 1:1 se muestran a continuación en la Tabla 22.

Tabla 22 Afinidad de unión de anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
223G5	6,6E+06	1,0E-04	1,6E-11
224C4	9,3E+06	9,8E-05	1,1E-11
230C9	6,8E+05	8,9E-05	1,3E-10
280.346.TSY	4,9E+05	3,4E-04	6,9E-10

- 15 -Los anticuerpos 223G5 y 224C4 (ambas variantes con modificaciones de estirpe germinal de 166G8) mostraron una afinidad muy alta para IL-22R (10-20 pM) mientras que el anticuerpo 230C9 tenía una afinidad de 0,13 nM. Todos los anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal presentaron una mayor afinidad que el anticuerpo de referencia 280.346.TSY (0,69 nM)
- 20 Debido al potencial efecto de avidez que se observa cuando se utiliza una molécula bivalente como ligando durante la medición de la afinidad, se probó una configuración experimental inversa. En esta configuración, los anticuerpos se recubrieron a 250 UR utilizando métodos convencionales. Se añadió IL22R humano monomérico en distintas concentraciones, y las afinidades calculadas utilizando el programa informático BIAevaluation utilizando un ajuste Langmuir 1:1 se muestran a continuación en la Tabla 23.
- 25

Tabla 23 Afinidad de unión del 230C9 al IL-22R humano

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
230C9	hIL22R	9,2E+05	2,2E-04

- 30 Desafortunadamente, el anticuerpo 223G5 se inactivó mediante el procedimiento de recubrimiento y no se pudo determinar la afinidad utilizando esta configuración.

La afinidad de 230C9 es consistente independientemente de la configuración de la medición de la afinidad, mostrando que el bajo recubrimiento utilizado en ambas condiciones es suficiente para reducir cualquier efecto de avidez.

12.2 Inhibición de la activación y señalización de IL-22R1 dependiente de IL-22 e IL-20

- 35 Los anticuerpos 218A7 (sin modificaciones de estirpe germinal) y 230C9 (el equivalente con modificaciones de estirpe germinal) se probaron junto con otros anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal en cuanto a su capacidad para neutralizar la señalización mediada por IL-22 e IL-20 a través de IL-22R1. El análisis se realizó utilizando los ensayos de proliferación basados en células descritos en los Ejemplos 6 y 9.

- 40 La Figura 9A muestra la capacidad de 218A7 y 230C9 para neutralizar la activación de IL-22R1 dependiente de IL-22. La Figura 9B muestra la capacidad de diferentes lotes de 230C9 para neutralizar la activación de IL-22R1 dependiente de IL-20. Las potencias relativas de los anticuerpos analizados se muestran a continuación en las Tablas 24 y 25.

Tabla 24 Potencia de los anticuerpos 218A7 y 230C9 en el bloqueo de la señalización de IL-22 a través de IL22R (línea celular BWhIL22R)

	CI50 de bloqueo de IL-22 (nM)	Potencia relativa con respecto a 280.346.TSY
218A7	0,28	2,5
230C9	0,56	1,2
230D5	0,62	1,1
230H2	0,66	1,0
280.346.TSY	0,69	1

(continuación)

	CI50 de bloqueo de IL-22 (nM)	Potencia relativa con respecto a 280.346.TSY
230B7	0,73	0,95

Tabla 24 Potencia del anticuerpo 230C9 en el bloqueo de la señalización de IL-20 a través de IL22R (línea celular Baf3hIL22R/IL20Rb)

	CI50 de bloqueo de IL-20 (nM)	Potencia relativa con respecto a 280.346.TSY
280.346.TSY	1,487	
230C9-N297Q (n.º 1)*	0,7807	1,9
230C9-N297Q (n.º 2)*	0,5671	2,6

* Distintos lotes de purificación del anticuerpo 230C9

5

12.3 Mapeo epítópico confirmatorio

El mapeo epítópico confirmatorio para los anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal 230C9 y 223G5 se llevó a cabo mediante análisis de FACS, como se describe en el Ejemplo 8.2. Se descubrió que el anticuerpo 230C9 compite por la unión a IL-22R1 con el anticuerpo de referencia 280.346.TSY y también 223G5. El anticuerpo 223G5 no compitió por la unión a IL-22R1 con el anticuerpo de referencia 280.346.TSY.

Los resultados del análisis de FACS se combinaron con los resultados de los ensayos de proliferación descritos anteriormente y las conclusiones con respecto a los epítopos se muestran en la Figura 10. Como se indica, se puede concluir que (i) el anticuerpo 230C9 se une a un epítopo distinto pero solapante en comparación con los epítopos a los que se une 280.346.TSY; y (ii) el anticuerpo 223G5 se une a un epítopo distinto que 280.346.TSY.

El análisis de FACS también se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 8.2 para estudiar la unión de los anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal a varios mutantes de IL-22R. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 26.

Tabla 26 Unión de anticuerpos a células que expresan mutantes de IL22R

Mutantes de BW-hIL-22R	A209D	W208A	Y60A	R112A
280.346.TSY	+	+	X	X
230C9	+	+	+	+/X
223G5	X	+	+	+

+/- = reconocimiento parcial del mutante que tiene R112A

Estos resultados confirman que los anticuerpos 230C9 y 223G5 se unen a un epítopo que no incluye una Y60. Se descubrió que la mutación A209D afectaba la unión de 223G5 mientras que la unión del anticuerpo de llama 166G8 no se vio afectada por este cambio. Esto es probablemente atribuible a las dificultades para detectar la sensibilidad de 166G8 a la mutación A209D (166G8 se probó solo una vez), y posiblemente atribuible a cambios leves en las secuencias de CDR durante las modificaciones de estirpe germinal de 166G8. Estos datos confirman que 280.346.TSY se une al D1 de IL22R, que 223G5 se une al D2 de IL22R y que 230C9 tiene un epítopo solapante pero distinto.

12.4 Reactividad cruzada con especies de anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal

El anticuerpo 230C9 se une a IL-22R humano, pero no presenta reactividad cruzada para IL-22R del ratón, rata y conejo. Esto es consistente con que 230C9 tiene un epítopo distinto en comparación con el anticuerpo de referencia 280.346.TSY - véase 12.3 arriba.

La capacidad de los anticuerpos para unirse a cyno-IL22R una vez expresados en células se probó haciendo construcciones químicas del dominio extracelular (ECD) de IL22R de las distintas especies fusionadas al transmembrana (TM) humano y los dominios intracelulares (ID, forma siglada de *intracellular domain*) humanos. Aunque la eficacia de la transfección transitoria no fue grande, el análisis de FACS mostró que el anticuerpo 230C9-N297Q, pero no el 223G5-N297Q, se unió al cynoIL22R_ECD-humanTM_humanICD como se observa por la presencia de un pico más amplio en el gráfico de FACS (véase la Figura 11 con las flechas que indican los picos más amplios).

Adicionalmente, cuando las construcciones químicas también se cotransfectaron con un gen indicador de STAT3 en células HEK, la actividad del IL22R después de la adición de IL22 humana pudo medirse en presencia o ausencia de anticuerpo neutralizante. Los resultados presentados a continuación en la tabla 27 muestran que todos los anticuerpos probados fueron capaces de neutralizar el IL22R humano y que solo los reactivos de forma cruzada

con primate (230C9 y 280.346.TSY) pudieron unirse y bloquear la actividad de las quimeras de cinomolgo y rhesus, lo que sugiere que estos anticuerpos serán funcionales en estudios con primates.

Tabla 27 Reactividad cruzada de anticuerpos para IL-22R con IL-22R humano, de rhesus y de cinomolgo

	CE50 (nM) para ECD humano	CE50 (nM) para ECD de Rhesus	CE50 (nM) para ECD de cinomolgo
224C4	0,30	Sin efecto	Sin efecto
230C9	0,28	0,48	0,57
280.346.TSY	0,26	0,43	0,16

5

12.5 Análisis de inmunogenicidad

La inmunogenicidad de los anticuerpos con modificaciones de estirpe germinal se evaluó utilizando herramientas de predicción. En particular, la presencia de péptidos inmunogénicos potenciales en los dominios variables se evaluó 10 utilizando la plataforma Epibase™ de Lonza (puntuación de DRB-1) utilizando la configuración "HLA class II - Caucasian v3.0". Esta plataforma analiza las especificidades de unión a HLA de todos los péptidos de 10 meros obtenidos de las secuencias de VH y VL. El perfil se realizó a nivel de alotipo para 15 DRB1,6 DRB3/4/5, 12 DQ y 7 DP, es decir, en total 40 receptores HLA de clase II. Se identificaron moléculas de unión a DRB1, DRB3/4/5 fuertes y 15 intermedias, así como moléculas de unión a los epítopos DQ y DP fuertes. El recuento de epítopos se realizó por separado para las moléculas de unión a DRB1 de afinidad intermedia y fuerte. Los péptidos que se unen a múltiples 20 alotipos del mismo grupo se contaron como uno. Se calculó una puntuación aproximada que expresaba un riesgo inmunogénico en el peor de los casos de la siguiente manera: Puntuación = ζ (recuento de epítopos x frecuencia de alotipos). En otras palabras, el número de epítopos que afectan a un alotipo de HLA particular se multiplica por la frecuencia alélica del alotipo afectado. Para una secuencia dada, los productos se sumaron para todos los alotipos de DRB1 utilizados en el estudio que están presentes en el 2 % o más de la población de raza blanca.

Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 28.

Tabla 28 Puntuaciones de DRB1 para los anticuerpos para IL-22R con modificaciones de estirpe germinal en comparación con diversos otros anticuerpos comerciales

	Puntuación de DRB1 (VH + VL)	Fuente
230C9	555	Llama con modificaciones de estirpe germinal
223G5	936	Llama con modificaciones de estirpe germinal
Adalimumab	830	Humano (presentación en fagos)
Trastuzumab (Herceptin)	959	Humanizado
Palivizumab (Synagis)	985	Humanizado
Dupilumab	1124	Humano (Velocimune)
Alemtuzumab (Campath)	1409	Humanizado
Rituximab (Rituxan)	1769	Químérico
Infliximab (Remicade)	1873	Químérico
Anticuerpo de ratón	3832	Ratón

Como puede observarse a partir de la tabla 28, el anticuerpo 230C9 tiene una puntuación de DRB1 muy baja, muy por debajo de otros anticuerpos comerciales, mientras que 223G5 tiene una puntuación de DRB1 baja comparable a otros anticuerpos humanos o humanizados disponibles en el mercado. Estos datos sugieren que 230C9 (y 223G5) tendrán un perfil de inmunogenicidad preferible.

Ejemplo 13 Estudio farmacocinético (PK) del anticuerpo 230C9-N297Q en monos cinomolgos

Se realizó un análisis farmacocinético del clon de anticuerpo 230C9. Se inyectaron por vía intravenosa dos monos cinomolgos una única dosis de anticuerpo de 10 mg/kg durante 2 h. Se tomaron muestras en distintos puntos temporales y se analizaron en cuanto a la concentración plasmática de mAb mediante ELISA. Específicamente, se revistió una placa de microtitulación (Maxisorb Nunc) con hIL22R recombinante 2 µg/ml (Biotechne; cat 2770-LR) en PBS durante una noche a 4 °C. La placa se lavó 3 veces con PBS-Tween y se bloqueó durante 2 horas con 250 µl de PBS-caseína al 1 %. Después de 3 lavados con PBS-Tween, se aplicaron las muestras. Todas las diluciones se realizaron en plasma agrupado al 1 % (este es un agrupamiento de 3 monos cinomolgos sin tratamiento previo). Se dejó que las muestras se unieran durante 2 horas a TA. A continuación, las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween y se aplicaron anticuerpos policlonales adsorbidos en mono anti-cadena ligera y pesada de IgG humanas biotinilado de cabra acoplados a HRP a una dilución de 50.000 veces (Bethyl, n.º de cat.: A80-319P) y se dejó que

se uniera durante 1 hora a TA. Después, las placas se lavaron 5 veces con PBS-Tween y se añadió el debilitador s(HS) TMB (SDT, #sTMB-W). Se dejó que la tinción continuara durante 10 minutos y luego se detuvo con H₂SO 1 N, después de lo cual se midió la densidad óptica a 450 nm. Las muestras se analizaron 3 veces y se utilizó 230C9-N297Q (del mismo lote que se inyectó en los animales) para una curva patrón.

- 5 Los parámetros PK de interés para un análisis del modelo de infusión i.v. de 2 compartimentos se muestran en la Tabla 29. Los perfiles farmacocinéticos para el anticuerpo 230C9-N297Q se muestran gráficamente en la Figura 12 (el resultado que se muestra es el resultado promedio de los dos monos). Estos datos muestran claramente que el anticuerpo tiene un tiempo medio de permanencia (TMP) largo. Curiosamente, aunque el anticuerpo contiene una
10 región Fc de IgG1 no glucosilada sin ninguna modificación para mejorar la semivida, la semivida de 230C9-N297Q es sorprendentemente larga. Específicamente, 230C9-N297Q tiene una semivida de aproximadamente 19,4 días. Por tanto, la semivida prolongada de los anticuerpos de la invención parece deberse a las propiedades de las regiones Fab.

15 **Tabla 29 Parámetros PK**

T _½	TMR	V1	V2	CL	K21	Cmáx	C en el día 30
19,4 días	26,2 días	45 ml/kg	68 ml/kg	4,3 ml/día	0,35	216 µg/ml	-26 µg/ml

- 20 Se llevó a cabo un estudio PK adicional en monos cinomolgos, administrando dosis únicas i.v. (0,1, 1,3, 10 y 30 mg/kg) de 230C9-N297Q a 10 monos en total. La cinética en los monos cinomolgos presentó una cinética no lineal de dos compartimentos. En dosis inferiores a 10 mg/kg, la depuración (CL) aumentó con la disminución de la dosis, lo que dio como resultado una disminución de la exposición (ABC) más que proporcional a la dosis con la disminución de las dosis. Este es un fenómeno bien conocido de los anticuerpos monoclonales (véanse la Tabla 30 y la Figura 13).

Tabla 30 Parámetros PK basados en 2 monos/por dosis y 5 grupos de dosis.

Parámetro	Estimación	Unidades	Err. Típ.	% de CV
tvV	39,7	ml/kg	2,77	7,0
tvCl	3,60	ml/(kg*día)	0,38	10,5
tvV2	27,7	ml/kg	5,40	19,5
tvCl2	42,1	ml/(kg*día)	24,3	57,8
tvVmáx	24,9	µg/(kg*día)	7,41	29,8
tvKm	1,0	µg/ml	0,01	9,96

- 25 El cambio de escala de estos parámetros para predecir la farmacocinética de ser humano da como resultado un perfil humano similar al que se puede esperar en base a los hallazgos empíricos de otras moléculas de IgG1 humanas, incluyendo una estimación puntual de la semivida humana (T_½) de aproximadamente 18 días de acuerdo con el estudio anterior informado anteriormente.

Ejemplo 14 Efectos farmacodinámicos (PD) del anticuerpo 230C9 N297Q en un mono cinomolgo

- 30 Se analizó el efecto farmacodinámico del anticuerpo 230C9 N297Q (ARGX-112) en un mono cinomolgo administrándolo al mono mediante inyección i.v. de 230C9 a distintas dosis (0,3, 1, 3, 10, 30 mg/kg). Además, se trató un corte de piel del mono con imiquimod (IMQ) para evaluar los efectos de 230C9 N297Q sobre la inflamación de la piel. Se ha informado que IMQ induce inflamación de la piel en ratones (Van Belle *et al.* 2012, J Immunol. 1 de enero; 188(1):462-9), y un informe también demuestra efectos similares en primates no humanos (Poirier *et al.* 2016, Exp Dermatol. Mar;25(3):233-4; Poirier *et al.* 2016, J Immunol. 1 de enero; 196(1):274-83) y en ser humano (Vinter *et al.* 2015, Br J Dermatol. feb; 172(2):345-53).

- 40 Después de 5 días de tratamiento con IMQ, se tomó una biopsia de un área de piel no tratada con IMQ y del área de piel tratada con IMQ para evaluar los efectos de 230C9 N297Q sobre los efectos inducidos por IMQ. Los efectos se evaluaron comparando el grosor epidérmico y la frecuencia de la de núcleos en proliferación en la epidermis (frecuencia de Ki67), y los resultados se muestran en la Figura 14. Las dosis crecientes de anticuerpo 230C9 N297Q pudieron normalizar el grosor epidérmico (Fig. 14A) y reducir la frecuencia de núcleos positivos para Ki67 (Fig. 14B). La CE₅₀ fue de aproximadamente 3 mg/kg.

Ejemplo 15 Relación de la respuesta PK sérica y PD del explante de piel después de una única infusión i.v. de 230C9 N297Q en monos cinomolgos

- 50 Se investigó la interacción con la diana en piel en monos cinomolgos a los que se les administró una única infusión intravenosa de 15 minutos (5 ml/kg) de anticuerpo 230C9 N297Q. Cinco monos hembras se dejaron sin tratar o se expusieron a 230C9 1, 5 o 30 mg/kg el día 1 de la prueba (tres animales por grupo). Se recogió sangre de todos los animales dosificados (3 x 150 µl) en distintos puntos temporales y se extrajo la última muestra el día 7. Las muestras

de suero (1 % v/v) se probaron para determinar los niveles de exposición a 230C9 N297Q mediante ELISA.

Se tomaron muestras de biopsias cutáneas (3 mm) el día -1 (predosis) y el día 7 de cada animal y se incubaron en presencia (día -1, día 7) o ausencia (día 7) de rhIL-22 durante 24 h a 37 °C en aire humidificado/CO₂ (95 %/5 %) antes de medir los niveles de ARNm de FLG2 mediante qPCR. Los resultados se muestran en la Figura 15.

La estimulación por rhIL22 dio como resultado una reducción de 5 veces de los niveles totales de ARNm de FLG2 en la piel. La represión de transcritos de FLG2 mediada por IL-22 se restableció significativamente en los animales tratados con 230C9 N297Q, lo que indica una exposición de la piel significativa en todos los grupos de dosis.

Ejemplo 16 Efecto de 230C9 N297Q en explantes de piel ex vivo de mono cinomolgo y humanos viables

Se utilizó piel abdominal recién obtenida de donantes humanos sanos para evaluar la capacidad del anticuerpo 230C9 N297Q de inhibir los niveles de ARNm de DEFB4 inducidos por rhIL-22.

Se colocaron biopsias cutáneas (3 mm) en posición vertical en placas de tejido de 96 pocillos y se cultivaron en una interfaz aire-líquido en 100 µl de medio EpiLife complementado con Suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos (HKGS, forma siglada de *Human Keratinocyte Growth Supplement*) sin hidrocortisona (Invitrogen).

Las muestras se incubaron con concentraciones crecientes de anticuerpo 230C9 N297Q durante 24 h a 37 °C en aire humidificado/CO₂ (95 %/5 %) antes de la estimulación con rhIL-22 (R&D Systems) 20 ng/ml durante 24 h adicionales a 37 °C. Los niveles relativos de expresión génica de DEFB4 en lisados de piel se determinaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando ensayos de expresión génica validados (Applied Biosystems) y un sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7900HT.

La Figura 16 muestra una reducción dependiente de la dosis de los niveles de ARNm de DEFB4 inducidos por rhIL-22 de un experimento representativo (CE_{50} [CI 95 %] = 4 nM [0,5-29 nM]; 4 donantes). Se obtuvo una potencia similar si se aumentaba el tiempo de preincubación de 230C9 N297Q a 48 h, lo que sugiere que se había alcanzado el equilibrio de unión de IL-22RA. Un anticuerpo de control de isotipo no tuvo ningún efecto sobre los aumentos de los niveles de ARNm de DEFB4 mediados por rhIL-22.

En biopsias de piel (3 mm) recién aisladas de monos cinomolgo (*Macaca fascicularis*), el gen DEFB4 no presentaba regulación por rhIL-22. Por el contrario, tanto FGL2 como LOR presentaban regulación a la baja después de 24 h de incubación con rhIL-22 utilizando el mismo protocolo que se describe para la configuración del explante de piel humana. Estas respuestas se bloquearon completamente mediante una preincubación de 24 h con el anticuerpo 230C9 N297Q (CE_{50} = 11 nM; ambos genes) como se muestra en la Figura 17.

Ejemplo 17 Eficacia de 230C9 N297Q en queratinocitos humanos

El ensayo se diseñó para probar la potencia de los anticuerpos para IL-22R en un ensayo funcional en queratinocitos humanos primarios. Las células se estimularon con una mezcla de citocinas de IL-4, IL-13, IL-22 (todas 10 ng/ml) e IFN-γ, 1 ng/ml durante 48 horas y luego se midió el nivel de CCL2 en el sobrenadante del cultivo utilizando la plataforma MSD.

Los queratinocitos se suspendieron en medio EpiLife (Life Technologies) con los siguientes complementos de crecimiento añadidos: EGF; EHB; insulina; transferrina y gentamicina/anfotericina. Las células se sembraron en proxyplates blancas de 384 pocillos (Perkin Elmer) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %/95 % de aire. A continuación, las células se trataron con 80 nl de anticuerpo (a distintas concentraciones como se muestra en la Figura 18) o vehículo. A continuación, se añadieron 40 µl de mezcla de estimulación (IL-4, IL-13, IL-22 (R&D systems, todas a una concentración final de 10 ng/ml) e IFN-γ (R&D systems, concentración final de 1 ng/ml)) y las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %/95 % de aire durante 2 días. Los pocillos de control se trataron con una mezcla de IL-4 e IL-13 (ambas 10 ng/ml) e IFN-γ, 1 ng/ml y se definió una inhibición del 100 % de la señalización de IL-22. La concentración de CCL2 en el sobrenadante del cultivo se midió con el kit MSD CCL2 (Mesoscale N.º de Cat K151AYB-2). La viabilidad de las células se midió con el reactivo PrestoBlue®.

La potencia de 230C9 N297Q se probó en 5 experimentos y mostró una inhibición dependiente de la dosis de los niveles de CCL2 con valores de CE_{50} de 0,10 nM [0,042-0,24 nM]. Los resultados experimentales representativos de un experimento se muestran en la Figura 18.

60 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> argenx BVBA

<120> ANTICUERPOS ANTI-IL-22R

<130> P144494WO00

<150> GB1612337.4
 <151> 15/07/2016

5 <160> 101

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> *Llama glama*

15 <400> 1

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

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

20 <210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> *Llama glama*

<400> 2

Ser	Tyr	Asp	Met	Ser
1			5	

25 <210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> *Llama glama*

30 <400> 3

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser
1				5					10				

35 <210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> *Llama glama*

40 <400> 4

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

45 Gly

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

50 <213> *Llama glama*

<400> 5

ES 2 903 412 T3

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

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

5 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

<400> 6

Val Gly Phe Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Glu Ser
 1 5 10

10 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

<400> 7

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

15 <210> 8
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

20 <400> 8

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

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

25 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

30 <400> 9

Ser Tyr Phe Met Ser
 1 5

35 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

40 <400> 10

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser
 1 5 10

45 <210> 11
 <211> 17

ES 2 903 412 T3

Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala His
1 5

5 <210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

10 <400> 17

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

15 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

20 <400> 18

Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

25 <210> 19
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

30 <400> 19

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

Glu Tyr Tyr Cys
20

35 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

40 <400> 20

Gln Ser Gly Ser Ser Ser Ala Asn Ala Val
1 5 10

45 <210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

50 <400> 21

Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
1 5 10

55 <210> 22
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Llama glama*

60 <400> 22

	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Leu Gly Lys
	1 5 10 15
	Thr Val Thr Ile Ser Cys
	20
5	<210> 23
	<211> 14
	<212> PRT
	<213> <i>Llama glama</i>
10	<400> 23
	Thr Gly Thr Ser Arg Asp Ile Gly Asp Tyr Asn Tyr Val Ser
	1 5 10
15	<210> 24
	<211> 15
	<212> PRT
	<213> <i>Llama glama</i>
	<400> 24
20	
	Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Leu Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
	1 5 10 15
25	<210> 25
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> <i>Llama glama</i>
	<400> 25
30	
	Lys Val Asn Thr Arg Ser Ser
	1 5
35	<210> 26
	<211> 20
	<212> PRT
	<213> <i>Llama glama</i>
	<400> 26
	Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
	1 5 10 15
	Asp Tyr Tyr Cys
	20
40	<210> 27
	<211> 10
	<212> PRT
	<213> <i>Llama glama</i>
45	<400> 27
	Ala Ser Tyr Arg Leu Tyr Ala Asp Tyr Val
	1 5 10
50	<210> 28
	<211> 10
	<212> PRT

ES 2 903 412 T3

<213> *Llama glama*

<400> 28

5 Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu
 L 10

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

10 <213> *Llama glama*

<400> 29

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

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

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

Ser Ser Ile Tyr Asn Asp Gly Ser Asn Thr Ala Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Val Gly Phe Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Glu Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30

<211> 103

<212> PRT

20 <213> *Llama glama*

<400> 30

25

ES 2 903 412 T3

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Ser Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Lys Ile Thr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala His Trp Tyr Gln
20 25 30

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

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

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu
65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ala Asn Ala Val Phe Gly Gly
85 90 95

Gly Thr His Leu Thr Val Leu
100

5 <210> 31
<211> 123
<212> PRT
<213> *Llama glama*

<400> 31

ES 2 903 412 T3

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

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

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile His Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Val Thr Pro Pro Gly Pro Phe Lys Ala His Tyr Asn Gly Met Lys Tyr
100 105 110

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

<210> 32

<211> 110

<212> PRT

5 <213> *Llama glama*

<400> 32

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Leu Gly Lys
1 5 10 15

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Leu Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

10 Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Leu Tyr

	85	90	95
	Ala Asp Tyr Val Phe Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu		
	100	105	110
	<210> 33		
	<211> 30		
5	<212> PRT		
	<213> <i>Llama glama</i>		
	<400> 33		
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
	1	5	10
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser		
10	20	25	30
	<210> 34		
	<211> 5		
15	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Fragmento de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal		
20	<400> 34		
	Ser Tyr Asp Met Asn		
	1	5	
	<210> 35		
25	<211> 14		
	<212> PRT		
	<213> <i>Llama glama</i>		
	<400> 35		
30	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser		
	1	5	10
	<210> 36		
	<211> 17		
35	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal		
40	<400> 36		
	Ser Ile Tyr Asn Asp Ala Ser Asn Thr Ala Tyr Ser Asp Ser Val Lys		
	1	5	10
45	Gly		
	<210> 37		
	<211> 32		
	<212> PRT		
50	<213> Secuencia artificial		

ES 2 903 412 T3

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

<400> 37

5

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

<210> 38

<211> 11

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

15

<400> 38

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

20

<210> 39

<211> 30

<212> PRT

<213> *Llama glama*

25

<400> 39

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

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

30

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> *Llama glama*

35

<400> 40

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 41

<211> 17

40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

45

<400> 41

Gly Ile His Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

50

Gly

<210> 42

ES 2 903 412 T3

<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

<400> 42

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

10 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Thr
20 25 30

<210> 43
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

20 <400> 43

Pro Pro Gly Pro Phe Lys Ala His Tyr Asn Gly Ala Lys Tyr
1 5 10

<210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> *Llama glama*

30 <400> 44

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 45
<211> 22
<212> PRT
<213> *Llama glama*

35 <400> 45

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

40 Thr Ala Arg Ile Thr Cys
20

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> *Llama glama*

45 <400> 46

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

50 <210> 47
<211> 7

<212> PRT
 <213> *Llama glama*
 5 <400> 47
 Gly Gln Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 48
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> *Llama glama*
 <400> 48
 Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 15 Glu Tyr Tyr Cys
 20 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> *Llama glama*
 <400> 49
 Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10
 25 <210> 50
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal
 <400> 50
 35 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys
 20 <210> 51
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> *Llama glama*
 <400> 51
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 45 1 5 10 15
 <210> 52
 <211> 360
 <212> PRT
 50 <213> *Llama glama*

ES 2 903 412 T3

<400> 52

Cys Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Gly Thr Gly Gly
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr
20 25 30

Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Thr
35 40 45

Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr
50 55 60

Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr
65 70 75 80

Cys Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr Ala Gly Cys Thr Ala Cys
85 90 95

Gly Ala Cys Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Cys Cys
100 105 110

Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala
115 120 125

ES 2 903 412 T3

Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Gly
130 135 140

Thr Cys Cys Ala Gly Thr Ala Thr Thr Thr Ala Thr Ala Ala Thr Gly
145 150 155 160

Ala Cys Gly Gly Thr Ala Gly Thr Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Cys
165 170 175

Cys Thr Ala Thr Thr Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly
180 185 190

Ala Ala Gly Gly Cys Cys Gly Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala
195 200 205

Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Ala Cys Gly Cys
210 215 220

Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Gly Thr Thr Gly Thr Ala Thr
225 230 235 240

Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Thr
245 250 255

Thr Gly Ala Ala Ala Thr Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys
260 265 270

Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
275 280 285

Gly Cys Ala Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Cys Thr Thr Thr Ala
290 295 300

Gly Thr Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Ala Gly
305 310 315 320

Thr Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly
325 330 335

Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly
340 345 350

Thr Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala
355 360

<210> 53
<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

<400> 53

Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala
1				5					10				15		

Asp	Tyr	Tyr	Cys												
				20											

10

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

<400> 54

20

Gln	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Asn	Ala	Val						
1				5						10					

<210> 55

<211> 10

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

30

<400> 55

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu						
1					5					10					

35

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

<400> 56

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

Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Cys										
						20									

45

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

50

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

<400> 57

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Ile	Gly	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser
1													
					5							10	

5

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

<400> 58

15

Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1														
					5					10				15

<210> 59

<211> 7

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

25

<400> 59

Glu	Val	Asn	Lys	Arg	Ser	Ser
1						
				5		

30

<210> 60

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

<400> 60

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

40

Asp	Tyr	Tyr	Cys
	20		

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

45

<213> *Llama glama*

<400> 61

Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Gln	Leu	Thr	Val	Leu
1									
				5					10

50

<210> 62

<211> 103

<212> PRT

55

<213> *Llama glama*

<400> 62

ES 2 903 412 T3

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala His Trp Tyr Gln
20 25 30

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

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

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu
65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ser Ala Asn Ala Val Phe Gly Gly
85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100

<210> 63

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

<400> 63

ES 2 903 412 T3

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

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

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

Ser Ser Ile Tyr Asn Asp Ala Ser Asn Thr Ala Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Gly Phe Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Glu Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 64

<211> 103

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

10 <400> 64

ES 2 903 412 T3

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala His Trp Tyr Gln
20 25 30

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

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

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp
65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ala Val Phe Gly Gly
85 90 95

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100

<210> 65

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

10 <400> 65

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

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

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile His Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Val Thr Pro Pro Gly Pro Phe Lys Ala His Tyr Asn Gly Ala Lys Tyr
 100 105 110

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

<210> 66

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

10

<400> 66

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

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

ES 2 903 412 T3

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Leu Tyr
85 90 95

Ala Asp Tyr Val Phe Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 67

<211> 450

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

10

<400> 67

ES 2 903 412 T3

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

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

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

Ser Ser Ile Tyr Asn Asp Ala Ser Asn Thr Ala Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Val Gly Phe Ser Gly Thr Tyr Tyr Ser Glu 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

ES 2 903 412 T3

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 Lys 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

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 Gln 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 Asp Glu Leu 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

ES 2 903 412 T3

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> 68

<211> 209

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

10

<400> 68

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala His Trp Tyr Gln
20 25 30

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

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

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp
65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Gln Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ala Val Phe Gly Gly
85 90 95

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

Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr
115 120 125

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

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

Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser

ES 2 903 412 T3

165

170

175

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

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

Ser

<210> 69

<211> 453

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

10

<400> 69

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

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

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile His Ile Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Val Thr Pro Pro Gly Pro Phe Lys Ala His Tyr Asn Gly Ala Lys Tyr
100 105 110

Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

ES 2 903 412 T3

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

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

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

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

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

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

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

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

ES 2 903 412 T3

405

410

415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

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

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 70

<211> 216

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal

10 <400> 70

ES 2 903 412 T3

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Ser Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Arg Leu Tyr
 85 90 95

Ala Asp Tyr Val Phe Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 71

<211> 574

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

ES 2 903 412 T3

Met Arg Thr Leu Leu Thr Ile Leu Thr Val Gly Ser Leu Ala Ala His
1 5 10 15

Ala Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser
20 25 30

Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr
35 40 45

Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp
50 55 60

Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn
65 70 75 80

Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val
85 90 95

Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg
100 105 110

Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys
115 120 125

Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr
130 135 140

Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe
145 150 155 160

ES 2 903 412 T3

His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln
165 170 175

Met His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr
180 185 190

Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp
195 200 205

Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp
210 215 220

Arg Thr Trp Thr Tyr Ser Phe Ser Gly Ala Phe Leu Phe Ser Met Gly
225 230 235 240

Phe Leu Val Ala Val Leu Cys Tyr Leu Ser Tyr Arg Tyr Val Thr Lys
245 250 255

Pro Pro Ala Pro Pro Asn Ser Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe
260 265 270

Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln Glu His Val Leu Ile Pro Val Phe Asp
275 280 285

Leu Ser Gly Pro Ser Ser Leu Ala Gln Pro Val Gln Tyr Ser Gln Ile
290 295 300

Arg Val Ser Gly Pro Arg Glu Pro Ala Gly Ala Pro Gln Arg His Ser
305 310 315 320

Leu Ser Glu Ile Thr Tyr Leu Gly Gln Pro Asp Ile Ser Ile Leu Gln
325 330 335

Pro Ser Asn Val Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ser Pro Leu Ser Tyr Ala
340 345 350

Pro Asn Ala Ala Pro Glu Val Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Pro Gln Val
355 360 365

Thr Pro Glu Ala Gln Phe Pro Phe Tyr Ala Pro Gln Ala Ile Ser Lys
370 375 380

Val Gln Pro Ser Ser Tyr Ala Pro Gln Ala Thr Pro Asp Ser Trp Pro
385 390 395 400

Pro Ser Tyr Gly Val Cys Met Glu Gly Ser Gly Lys Asp Ser Pro Thr

ES 2 903 412 T3

405

410

415

Gly Thr Leu Ser Ser Pro Lys His Leu Arg Pro Lys Gly Gln Leu Gln
420 425 430

Lys Glu Pro Pro Ala Gly Ser Cys Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Gln
435 440 445

Glu Val Thr Ser Leu Ala Met Glu Glu Ser Gln Glu Ala Lys Ser Leu
450 455 460

His Gln Pro Leu Gly Ile Cys Thr Asp Arg Thr Ser Asp Pro Asn Val
465 470 475 480

Leu His Ser Gly Glu Glu Gly Thr Pro Gln Tyr Leu Lys Gly Gln Leu
485 490 495

Pro Leu Leu Ser Ser Val Gln Ile Glu Gly His Pro Met Ser Leu Pro
500 505 510

Leu Gln Pro Pro Ser Arg Pro Cys Ser Pro Ser Asp Gln Gly Pro Ser
515 520 525

Pro Trp Gly Leu Leu Glu Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Glu Ala Lys
530 535 540

Ser Pro Ala Pro Glu Thr Ser Asp Leu Glu Gln Pro Thr Glu Leu Asp
545 550 555 560

Ser Leu Phe Arg Gly Leu Ala Leu Thr Val Gln Trp Glu Ser
565 570

<210> 72

<211> 1725

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 72

ES 2 903 412 T3

atgaggacgc tgctgaccat cttgactgtg ggatccctgg ctgctcacgc ccctgaggac	60
ccctcggtac tgctccagca cgtgaaattc cagtccagca actttaaaaa catcctgacg	120
tgggacagcg ggccggaggg caccccagac acggtctaca gcatcgagta taagacgtac	180
ggagagaggg actgggtggc aaagaaggc tgcagcggg tcacccggaa gtcctgcaac	240
ctgacggtgtt agacgggcaa cctcacggag ctctactatg ccagggtcac cgctgtcagt	300
gcgggaggcc ggtcagccac caagatgact gacaggttca gctcttgca gcacactacc	360
ctcaagccac ctgatgtgac ctgtatctcc aaagttagat cgattcagat gattgttcat	420
cctaccccca cgccccatccg tgcaggcgat ggccaccggc taaccctgga agacatcttc	480
catgacctgt tctaccactt agagctccag gtcaaccgca cctaccaaattt gcaccttggaa	540
gggaagcaga gagaatatga gttcttcggc ctgacccttg acacagagtt ccttggcacc	600
atcatgattt gcgccccac ctgggccaag gagagtgcgg cctacatgtg ccgagtgaag	660
acactgccag accggacatg gacctactcc ttctccggag cttccctgtt ctccatgggc	720
ttcctcgctg cagtaactctg ctacctgagc tacagatatg tcaccaagcc gcctgcaccc	780
cccaactccc tgaacgtcca gcgagtcctg actttccagc cgctgcgtt catccaggag	840
cacgtcctga tccctgtctt tgacctcagc ggccccagca gtctggccca gcctgtccag	900
tactcccaaga tcagggtgtc tggaccaggag gacccctgcag gagctccaca gcccatacg	960
ctgtccgaga tcacctactt agggcagcca gacatctcca tcctccagcc ctccaaacgtg	1020
ccacccccc agatcctctc cccactgtcc tatgccccaa acgctgcggc tgaggtcgaaa	1080
ccccccatcct atgcacctca ggtgacccccc gaagctcaat tcccattcta cgccccacag	1140
gccatctcta aggtccagcc ttcccttat gcccctcaag ccactccggc cagctggcct	1200
ccctccatatg ggttatgcat ggaaggttct ggcaaaagact ccccaactgg gacactttct	1260
agtccctaaac accttaggcc taaaggctcag ctccagaaag agccaccagc tggaaagctgc	1320
atgttaggtg gcctttctct gcaggaggtg acctcccttg ctatggagga atcccaagaa	1380
gcaaaatcat tgcaccagcc cctgggatt tgcacagaca gaacatctga cccaaatgtg	1440
ctacacagtg gggaggaagg gacaccacag tacctaaagg gccagctccc cctcccttcc	1500
tcagtcaga tcgagggcca ccccatgtcc ctccctttgc aacctccatgc ccgtccatgt	1560
tccccctcgg accaagggtcc aagtccctgg ggccctgctgg agtcccttgt gtgtcccaag	1620
gatgaagcca agagcccagc ccctgagacc tcagacctgg agcagccac agaactggat	1680
tctctttca gaggcctggc cctgactgtg cagtggagat cctga	1725

<210> 73
<211> 309
<212> ADN
<213> *Llama glama*

	<400> 73	
	aattttatgc tgactcagcc ctccgcggtg tccgtgtctt tgggacagac ggccaagatc	60
	acctgccaag gggctatta tgctcaactgg taccaggaga agccaggcca gcggcgttg	120
	tttgtcatct atggaaataa taataggccc tcagggatcc ctgagcgctt ctctggctcc	180
	agttctggga acacagccac cctgaccatc agcggggccc aggctgagga cgaggccgag	240
	tattactgtc agtcaggaag cagtagtgct aatgctgtgt tcggcggagg gaccatctg	300
	accgtcctg	309
5	<210> 74	
	<211> 369	
	<212> ADN	
	<213> <i>Llama glama</i>	
10	<400> 74	
	caggtgcagc tggggagtc tggggaggc ttgggtgcagc ctgggattc tctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcgga agctattca tgagctgggt ccgccaggct	120
	ccagggaaagg ggcccggatg ggtctcaggt attcatatta gtgggttat tacatactac	180
	ttagactccg tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatga acaacctgaa acctgaggac acggccgtgt attattgtgt aacacccccg	300
	ggcccccattta aggcccattta caatggcatg aagtactggg gcaaaggac cctggtcacc	360
	gtctcctca	369
15	<210> 75	
	<211> 330	
	<212> ADN	
	<213> <i>Llama glama</i>	
20	<400> 75	
	aattttatgc tgactcagcc tccctccgtg tctggaaactc tgggaaagac ggtcaccatc	60
	tcctgcactg gaaccagtcg tgacattggg gactataact atgtctcctg gtatcaacag	120
	ctcccaggat tggcccccata actcctgatc tataaagtca acactcgatc ctcagggacc	180
	cctgatcgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ccctgaccat ctctggctc	240
	cagtcgtagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gactgtacgc cgattatgtg	300
	ttcggcggag ggacccatct gaccgtcctg	330
25	<210> 76	
	<211> 360	
	<212> ADN	
	<213> <i>Llama glama</i>	
	<400> 76	

	caggtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttgggtcagc ctgggggttc tctgagactc	60
	tcctgtcag cctctggatt cacttcagt agctacgaca tgagctgggt ccgccaggct	120
	ccagggaaagg ggctggagtg ggtgtccagt atttataatg acggtagtaa cacagcctat	180
	tcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacgttgtat	240
	ctgcaaatga acagcttgaa atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaaagttggc	300
	tttagtgta cttaactacag tgaatcatgg ggccagggga cccaggtcac cgtgtcctca	360
5	<210> 77 <211> 309 <212> ADN <213> <i>Llama glama</i>	
	<400> 77	
	ctgcctgtgc tgactcagcc ctccgcggtg tccgtgtctt tggacagac ggccaggatc	60
	acctgccaag gggctatta tgctcaactgg taccagcaga agccaggcca gcgcctgtg	120
	ctggtcatct atggacagaa taataggccc tcagggatcc ctgagcgctt ctctggctcc	180
	ggcgctggga acacagccac cctgaccatc agcggggccc aggctgagga cgaggctgag	240
	tattactgtc agtcaggaag cagtagtgct aatgctgtgt tcggcggagg gaccaagctg	300
10	accgtcctc	309
	<210> 78 <211> 360 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal	
20	<400> 78	
	caggtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttgggtcagc ctgggggttc tctgagactc	60
	tcctgtgctg cctctggatt cacttcagt agctacgaca tgaactgggt ccgccaggct	120
	ccagggaaagg ggctggagtg ggtgtccagc atttataacg acgccagtaa cacagcctat	180
	tcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca actcaaagaa cacgttgtat	240
	ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagttggc	300
	tttagtgta cttaactacag tgaatcatgg ggccagggga ccctcgtcac tgtctcctca	360
25	<210> 79 <211> 309 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal	
30	<400> 79	

	tcctacgaac tgactcagcc ctccctcggtg tccgtggcgt tgggacagac ggccaggatc	60
	acctgccaag gaggctatta tgcacactgg taccagcaga agccaggcca ggccccctgtg	120
	ctggtcatct atggacagaa taataggccc tcagggatcc ctgaggcgctt ctctggctcc	180
	ggcgctggga acacagccac cctgacaatac acccgccccc aggctgagga cgaggctgac	240
	tattactgtc agtcaggaag cagtagttct aatgctgtgt tcggcggagg gaccaagctg	300
	accgtcctc	309
	<210> 80	
	<211> 369	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal	
	<400> 80	
	caggtgcagc tcgtggagtc tgggggcggc ttgggtgcagc ctggggattc tctgagactc	60
	tcctgtgcag cctctggatt caccttca agctatttca tgagctgggt ccgccaggct	120
	ccagggaaagg ggcccgagtg ggtctcaggt attcatatta gtgggttat tacatactac	180
	acggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgcaaagaa cacgctgtat	240
	ctgcaaatac acagccttag agctgaggac acggccgtgt attattgtgt aacacccccc	300
	ggcccccattta aggcccattta caatggcgcg aagtactggg gcaaaggac cctggtcact	360
	gtctcctca	369
15	<210> 81	
	<211> 330	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia de anticuerpo con modificaciones de estirpe germinal	
	<400> 81	
	cagtctgccc tgactcagcc tccctccgtg tctggatctc ctggacagtc tgtcaccatc	60
	tcctgcactg gaaccagtag tgacattggg tcctataact atgtctcctg gtatcaacag	120
	ctcccaggaa aggcccccaa actcctgatc tatgaggtca acaagcgatc ctcaggggtc	180
	cctgatcgct tctctggctc caagtcaggc aacacggcct ccctgaccat ctctggctc	240
	caggctgagg acgaggctga ttattactgt gcctcatata gactgtacgc cgattatgt	300
25	ttcggcggag ggacccaact gaccgtcctc	330
	<210> 82	
	<211> 10	
	<212> PRT	
30	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 82	

ES 2 903 412 T3

5 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 1 5 10

5 <210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 83

10 Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5

15 <210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 84

20 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5

20 <210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 85

30 Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr
 1 5 10

30 <210> 86
<211> 50
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 86

35 Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys
 1 5 10 15

40 Pro Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro
 20 25 30

45 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 35 40 45

50 Cys Pro
 50

40 <210> 87
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 87

45 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 1 5

5 <210> 88
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 88

Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro
1					5	

10 <210> 89
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 89

Cys	Pro	Ser	Cys	Pro
1				5

20 <210> 90
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 90

Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro
1					5		

30 <210> 91
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 91

Glu	Arg	Lys
1		

40 <210> 92
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 92

Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro
1				5					10

45 <210> 93
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 93

Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro
1					5	

55 <210> 94
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60

ES 2 903 412 T3

<220>
<223> secuencia EST

<400> 94

5

Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg
1 5 10 15

Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu
20 25 30

Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu
35 40 45

Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr
50 55 60

Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala
65 70 75

<210> 95

<211> 78

10

<212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<400> 95

Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg
1 5 10 15

Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu
20 25 30

Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu
35 40 45

Gly Gly Glu Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr
50 55 60

Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser
65 70 75

15

<210> 96

<211> 79

20

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 96

Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg

ES 2 903 412 T3

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asp Leu Ser
 20 25 30

Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met Val Asn His
 35 40 45

Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp
 50 55 60

Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser
 65 70 75

<210> 97

<211> 79

5 <212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 97

Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg
 1 5 10 15

Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asp Leu Ser
 20 25 30

Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met Val Asn His
 35 40 45

Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp
 50 55 60

10 Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser
 65 70 75

<210> 98

<211> 77

15 <212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 98

Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg
 1 5 10 15

Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asp Leu Ser
 20 25 30

Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly
 35 40 45

ES 2 903 412 T3

Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu
 50 55 60

Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser
 65 70 75

<210> 99

<211> 293

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 99

Leu Arg Leu Glu Tyr Leu Ile Arg Leu Thr Ile Gly Tyr Arg Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Thr Ala Ala Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val
 20 25 30

Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu
 35 40 45

Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp
 50 55 60

Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr
 65 70 75 80

Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg
 85 90 95

Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn Leu Thr
 100 105 110

Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser
 115 120 125

Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu
 130 135 140

Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met
 145 150 155 160

Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg
 165 170 175

Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu
 180 185 190

ES 2 903 412 T3

Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu
195 200 205

Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile
210 215 220

Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met Cys
225 230 235 240

Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Ile Glu Gly Arg Asp
245 250 255

Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260 265 270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Arg Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu
290

<210> 100

<211> 293

5 <212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<400> 100

Leu Arg Leu Glu Tyr Leu Ile Arg Leu Thr Ile Gly Tyr Arg Leu Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ala Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val
20 25 30

Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu
35 40 45

Gln His Val Lys Phe Gln Ser Asn Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp
50 55 60

Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr
65 70 75 80

Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg
85 90 95

Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn His Thr
100 105 110

ES 2 903 412 T3

Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser
115 120 125

Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Asn Ser Leu Gln His Thr Ala Leu
130 135 140

Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Pro Lys Val Arg Ser Ile Gln Met
145 150 155 160

Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg
165 170 175

Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu
180 185 190

Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Glu Gln Arg Glu
195 200 205

Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile
210 215 220

Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser Lys Lys Ser Ala Pro Tyr Met Cys
225 230 235 240

Arg Val Arg Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Ile Glu Gly Arg Asp
245 250 255

Met Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260 265 270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu
290

<210> 101

<211> 292

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 101

Leu Arg Leu Glu Tyr Leu Ile Arg Leu Thr Ile Gly Tyr Arg Leu Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ala Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val
20 25 30

ES 2 903 412 T3

Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu
35 40 45

Gln His Val Lys Phe Gln Ser Asn Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp
50 55 60

Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr
65 70 75 80

Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg
85 90 95

Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn His Thr
100 105 110

Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser
115 120 125

Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Asn Ser Leu Gln His Thr Ala Leu
130 135 140

Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Pro Lys Val Arg Ser Ile Gln Met
145 150 155 160

Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg
165 170 175

Leu Thr Leu Glu Asp Ile Tyr Asp Leu Ser Tyr His Leu Glu Leu Gln
180 185 190

Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr
195 200 205

Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met
210 215 220

Ile Cys Val Pro Thr Trp Ser Lys Lys Ser Ala Pro Tyr Met Cys Arg
225 230 235 240

Val Arg Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Ile Glu Gly Arg Asp Met
245 250 255

Asp Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
260 265 270

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

ES 2 903 412 T3

275

280

285

Lys Asp Thr Leu
290

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a IL-22R, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera y donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una combinación de secuencias de CDR de cadena pesada variable: HCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6; HCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 36; y HCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 34, y una combinación de secuencias de CDR de cadena ligera variable: LCDR3 que comprende la SEQ ID NO: 54; LCDR2 que comprende la SEQ ID NO: 47; y LCDR1 que comprende la SEQ ID NO: 16.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una combinación de un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) seleccionado de lo siguiente: un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63 o una secuencia de aminoácidos al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 %
- 10 15 idéntica a la misma y un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64 o una secuencia de aminoácidos al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma.
- 20 25 3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera seleccionada de lo siguiente: una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67 o una secuencia de aminoácidos al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 68 o una secuencia de aminoácidos al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la misma.
- 30 35 4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que contiene la región bisagra, el dominio CH2 y/o el dominio CH3 de una IgG humana.
5. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que presenta una alta homología con una IgG humana, preferentemente IgG1.
- 30 35 6. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 6 unido operativamente a secuencias reguladoras que permiten la expresión del anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno, el dominio de cadena pesada variable o el dominio de cadena ligera variable en una célula hospedadora o sistema de expresión sin células.
- 40 45 8. Una célula hospedadora o un sistema de expresión sin células que contiene el vector de expresión de la reivindicación 7.
9. Un método de producción de un anticuerpo recombinante o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende cultivar la célula hospedadora o el sistema de expresión sin células de la reivindicación 8 en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno expresado.
10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y al menos un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 50 11. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso como medicamento.
12. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento o profilaxis de la psoriasis, la artritis psoriásica o la dermatitis atópica.

Fig.1

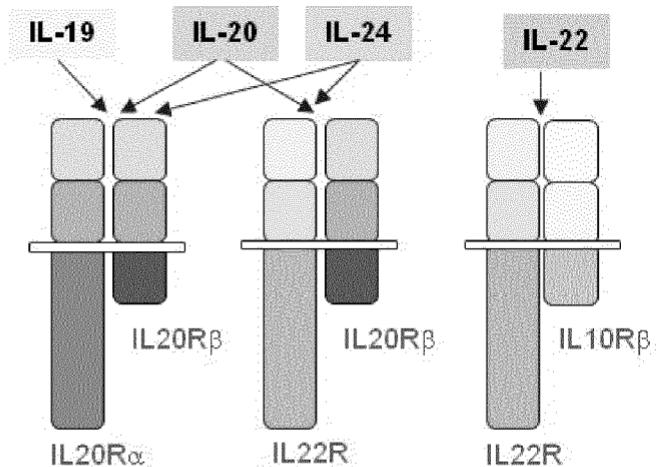


Fig.2

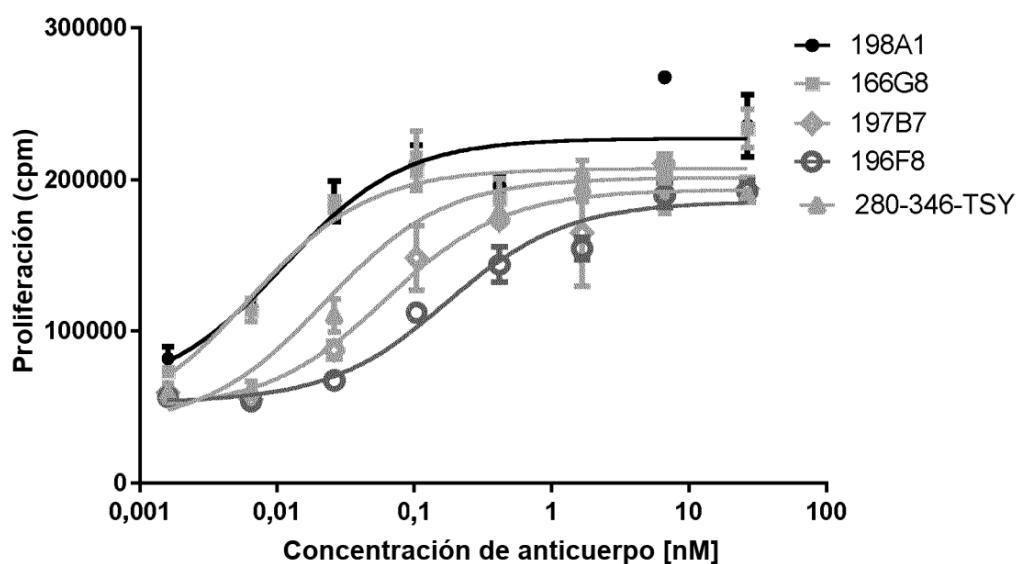
1 MRTLLTILTV GSLAAHAPED PSDLLQHVKF QSSNFENILT WDSGPEGTPD
51 TVYSIEYKTY GERDWVAKKG CQRITRKSCN LTVETGNLTE LYYARVTAVS
101 AGGRSATKMT DRFSSLQHTT LKPPDVTCIS KVRSIQMIVH PTPTPIRAGD
151 GHRLTLEDIF HDLFYHLELQ VNRTYQMHLG GKQREYEFFG LTPDTEFLGT
201 IMICVPTWAK ESAPYMCRVK TLPDRTWTYS FSGAFLFSMG FLVAVLCYLS
251 YRYVTKPPAP PNSLNVQRVL TFQPLRFIQE HVLIPVFDLS GPSSLAQPVQ
301 YSQIRVSGPR EPAGAPQRHS LSEITYLGQP DISILQPSNV PPPQILSPLS
351 YAPNAAPEVG PPSYAPQVTP EAQFPFYAPQ AISKVQPSSY APQATPDSWP
401 PSYGVCMEGS GKDSPTGTLS SPKHLRPKGQ LQKEPPAGSC MLGGQLSLQEV
451 TSLAMEESQE AKSLHQPLGI CTDRTSDPNV LHSGEEGTPQ YLKQQLPLLS
501 SVQIEGHPMs LPLQPPSRPC PSDQGPSPW GLLESLVCPK DEAKSPAPET
551 SDLEQPTELD SLFRGLALTV QWES

Fig.3

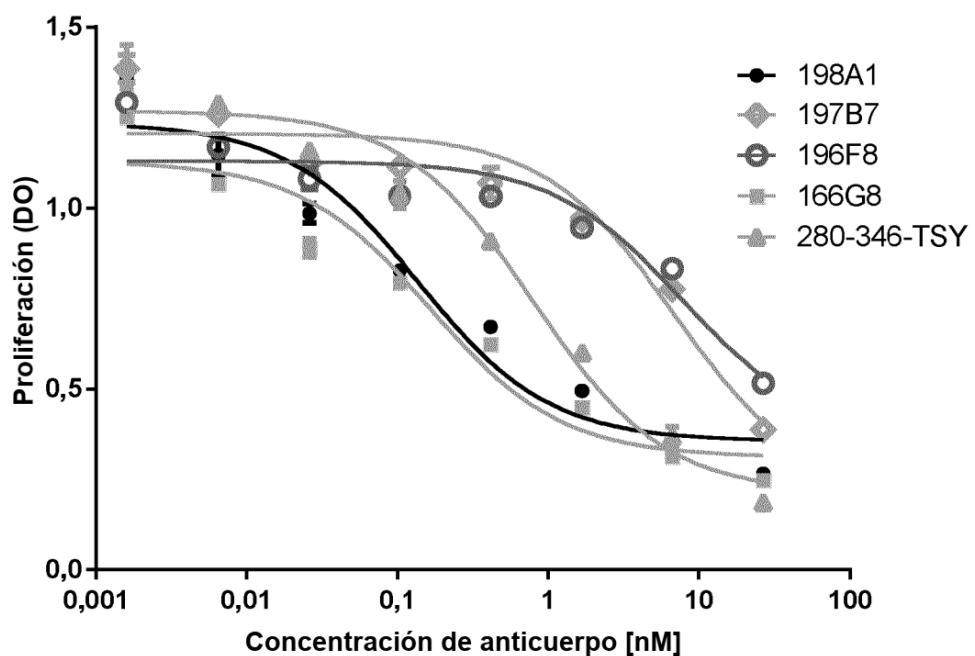
1 ATGAGGACGC TGCTGACCAT CTTGACTGTG GGATCCCTGG CTGCTCACGC CCCTGAGGAC
 61 CCCTCGGATC TGCTCCAGCA CGTCAAATT CAGTCCAGCA ACTTTGAAAA CATCCTGAC
 121 TGGGACAGCG GGCCGGAGGG CACCCCAGAC ACGGTCTACA GCATCGAGTA TAAGACGTAC
 181 GGAGAGAGGG ACTGGGTGGC AAAGAAGGGC TGTCAGCGGA TCACCCGGAA GTCTGCAAC
 241 CTGACGGTGG AGACGGGCAA CCTCACGGAG CTCTACTATG CCAGGGTCAC CGCTGTCAGT
 301 GCAGGGAGGCC GGTCAGCCAC CAAGATGACT GACAGGTTCA GCTCTTGCA GCACACTACC
 361 CTCAAGCCAC CTGATGTGAC CTGTATCTCC AAAGTGAGAT CGATTCAAGAT GATTGTTCAT
 421 CCTACCCCCA CGCCCATCCG TGCAGGGCAT GCCAACCGGC TAACCCGGAA AGACATCTTC
 481 CATGACCTGT TCTACCACCT AGAGCTCCAG GTCAACCGCA CCTACCAAAT GCACCTTGG
 541 GGGAAAGCAGA GAGAATATGA GTTCTCGGC CTGACCCCCCTG ACACAGAGTT CCTGGCACC
 601 ATCATGATT GCGTTCCAC CTGGGCCAAG GAGAGTGCCTC CCTACATGTG CCGAGTGAAG
 661 ACACGCCAG ACCGGACATG GACCTACTCC TTCTCCGGAG CCTTCCTGTT CTCCATGGGC
 721 TTCTCGTCG CAGTACTCTG CTACCTGAGC TACAGATATG TCACCAAGCC GCCTGCACCT
 781 CCCAACTCCC TGAACGTCCA GCGAGCTCTG ACTTTCCAGC CGCTGGCTT CATCCAGGAG
 841 CACGTCCTGA TCCCTGTCTT TGACCTCAGC GGCCCCAGCA GTCTGGCCCA GCCTGTCCAG
 901 TACTCCCAGA TCAGGGTGTG TGGACCCAGG GAGCCTGAG GAGCTCCACA GCGGCATAGC
 961 CTGTCCGAGA TCACCTACTT AGGGCAGCCA GACATCTCCA TCCTCCAGCC CTCCAACGTG
 1021 CCACCTCCCC AGATCCTCTC CCCACTGTCC TATGCCCAA ACGCTGCCCG TGAGGTCGGG
 1081 CCCCATCTT ATGCACCTCA GGTGACCCCC GAAGCTCAAT TCCCATTCTA CGCCCCACAG
 1141 GCCATCTCTA AGGTCCAGCC TTCCTCTTAT GCCCCCTCAAG CCACTCCGGA CAGCTGGCT
 1201 CCCTCCTATG GGGTATGCAT GGAAGGTTCT GGCAAAGACT CCCCCACTGG GACACTTTCT
 1261 AGTCTAAAC ACCTTAGGCC TAAAGGTCAAG CTTCAGAAAG AGCCACCCAGC TGGAAGCTGC
 1321 ATGTTAGGTG GCCTTCTCT GCAGGAGGTG ACCTCCTTG CTATGGAGGA ATCCAAGAA
 1381 GCAAATCAT TGCACCAGCC CCTGGGGATT TGCACAGACA GAACATCTGA CCCAAATGTG
 1441 CTACACAGTG GGGAGGAAGG GACACCACAG TACCTAAAGG GCCAGCTCCC CCTCCTCTCC
 1501 TCAGTCCAGA TCGAGGGCCA CCCCCATGTCC CTCCCTTTGC AACCTCTTC CGTCCATGT
 1561 TCCCCCTCGG ACCAAGGTCC AAGTCCCTGG GGCCTGCTGG AGTCCCTGT GTGCCCAAG
 1621 GATGAAGCCA AGAGCCCAGC CCCTGAGACC TCAGACCTGG AGCAGCCAC AGAACTGGAT
 1681 TCTTTTCA GAGGCCTGGC CCTGACTGTG CAGTGGGAGT CCTGA

Fig.4

A.



B.



ES 2 903 412 T3

Fig.5

A

B			
BC029273.1	VRSQIMIVHPTPTPIAGDGHRLTLEDIFHDLFYHLELQVNRTYQM	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 94
IL22RA1-ECD-HIS	-	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 94
01113239 (rhesus)	-	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 95
CS371752 (CINO)	E.....	SEQ ID NO: 96	SEQ ID NO: 96
FS368027 (CINO)	Y-.....S.....	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 97
FS371904 (CINO)	Y-.....VN.....VN.....S.....	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 98
*resto implicado directamente en la unión de IL22.			
ser humano rhesus cino1	1 LRLEYLIRLTIGYRLNGTAATMGWSCIILFLVATATGVHSPEPDSDLQQHVKFQOSSNNENLTWDGPEGTPDTVYSIEYKTYGERDWAKKGQCRITRK 1	101 SCNLIVETGNLTELYARYAVSAGGRSATKMTDRFSSLQHTTLKPDFVCISKVRSLQMVHPTPTPIAGDGHRLLTEDIFHDLFYHLELQVNRTYQM 101
ser humano rhesus	N.....N.....N.....N.....N.....N.....A.....P.....	H.....H.....H.....H.....H.....H.....A.....P.....

2

user humano	1	LRLEYLIRLTIGYRLNGTAATMGWSCIILFLYVATATGVHSPEDPSDLIQHQVKFQSSNNFENITLWDSSGPEGTPDTVYSIEYKTYGERDWA rhesus	1	1	LRLEYLIRLTIGYRLNGTAATMGWSCIILFLYVATATGVHSPEDPSDLIQHQVKFQSSNNFENITLWDSSGPEGTPDTVYSIEYKTYGERDWA cynomol	1	1	1
user humano	101	SCNLNTVEJGNLTLYARYAVSAGGRSATRMTDRFSSLQHTTLKPPDYTCISKVRSIGNIVHPTPTPIRAGDGHRLLTLEDIFHDLYFHLELQVNRTYQM rhesus	101	101	SCNLNTVEJGNLTLYARYAVSAGGRSATRMTDRFSSLQHTTLKPPDYTCISKVRSIGNIVHPTPTPIRAGDGHRLLTLEDIFHDLYFHLELQVNRTYQM cynomol	101	101	101
user humano	201	HLGGKOREYEFFGLTPDTEFLGTMICVPTWAKESAPYMCRVKTLPLDRTWT rhesus	201	201	HLGGKOREYEFFGLTPDTEFLGTMICVPTWAKESAPYMCRVKTLPLDRTWT cynomol	201	201	201
user humano	200	bucle6 (PTW; unión de IL22, próximo a la delección de cytIL22R)	200	200	bucle6 (PTW; unión de IL22, próximo a la delección de cytIL22R)	200	200	200

Fig. 6

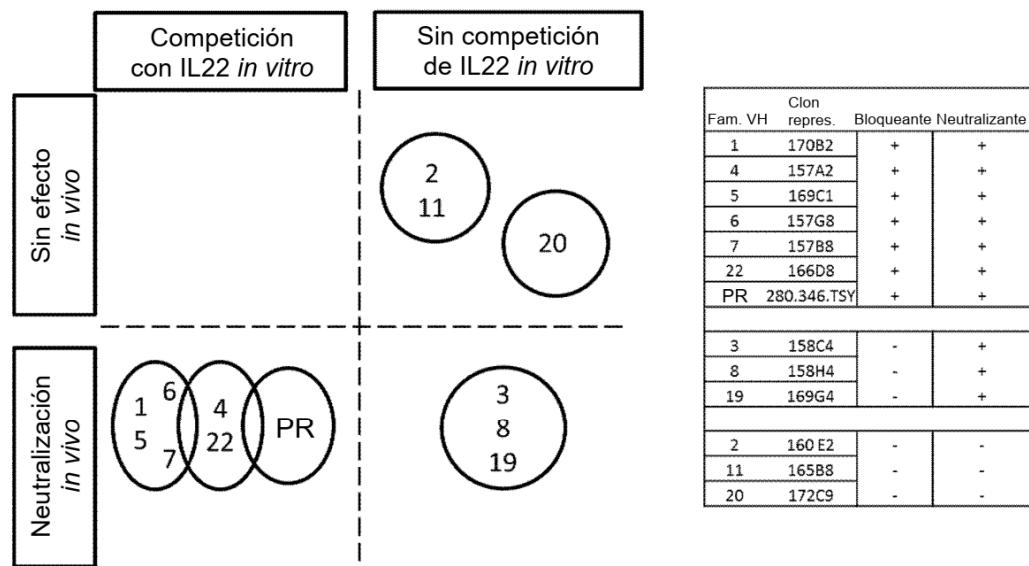


Fig. 7

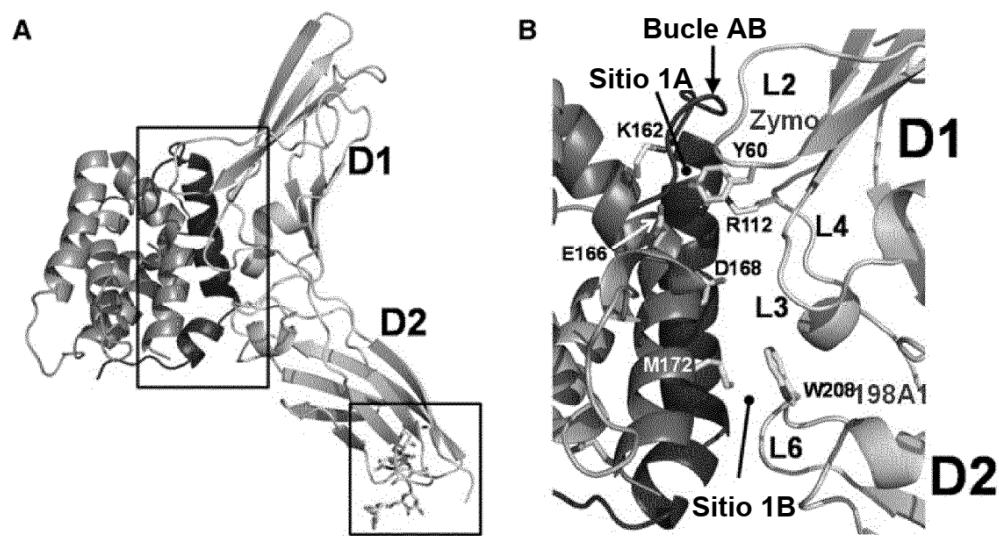


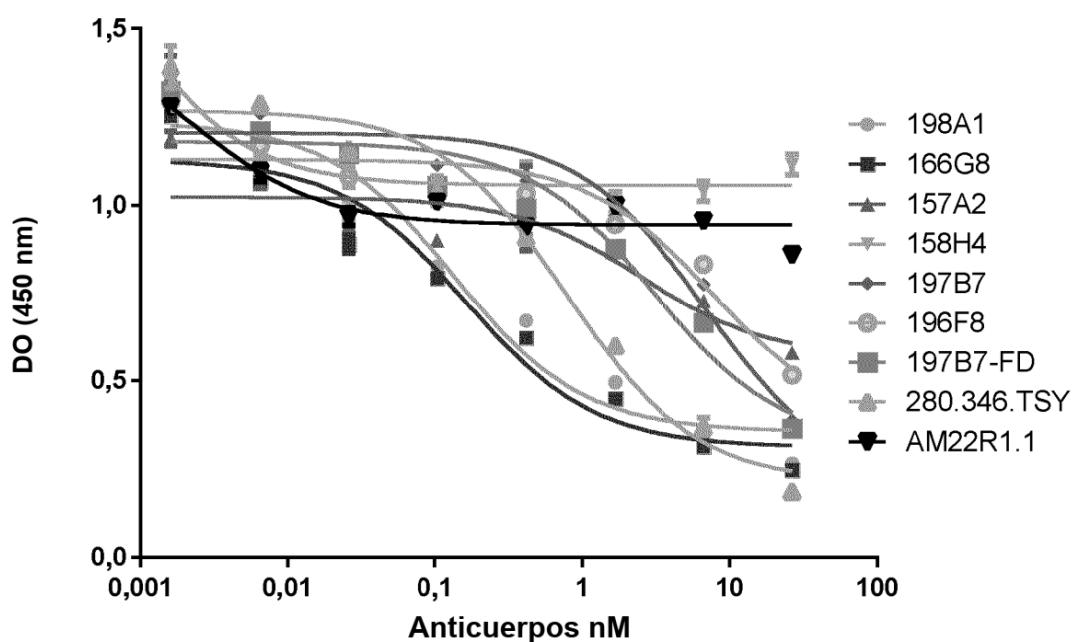
Fig. 8

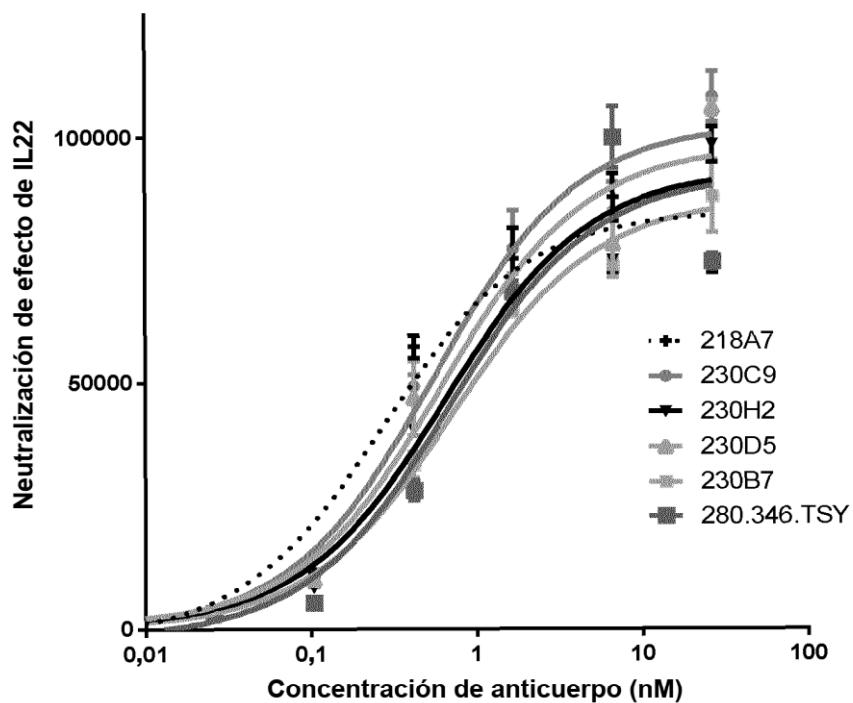
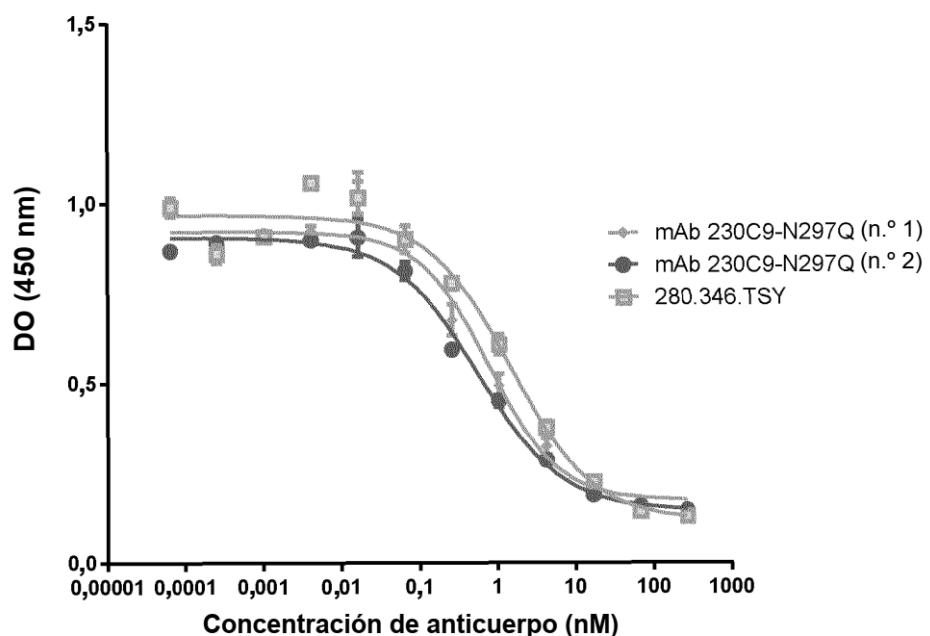
Fig. 9**A****B**

Fig. 10

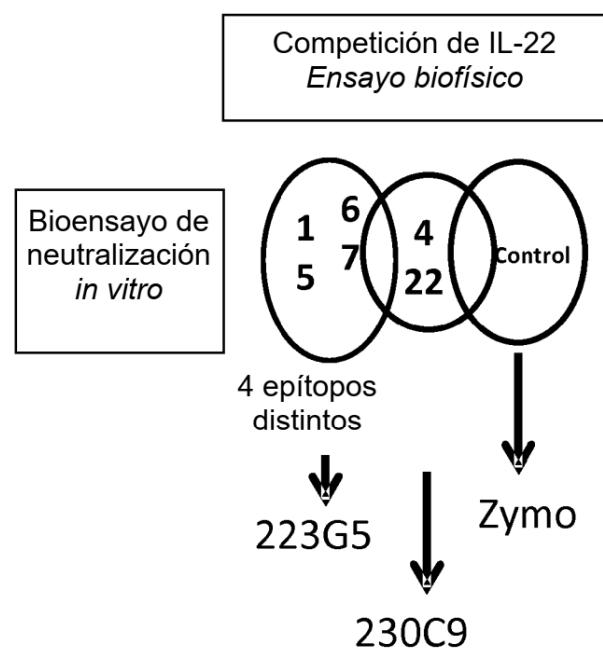


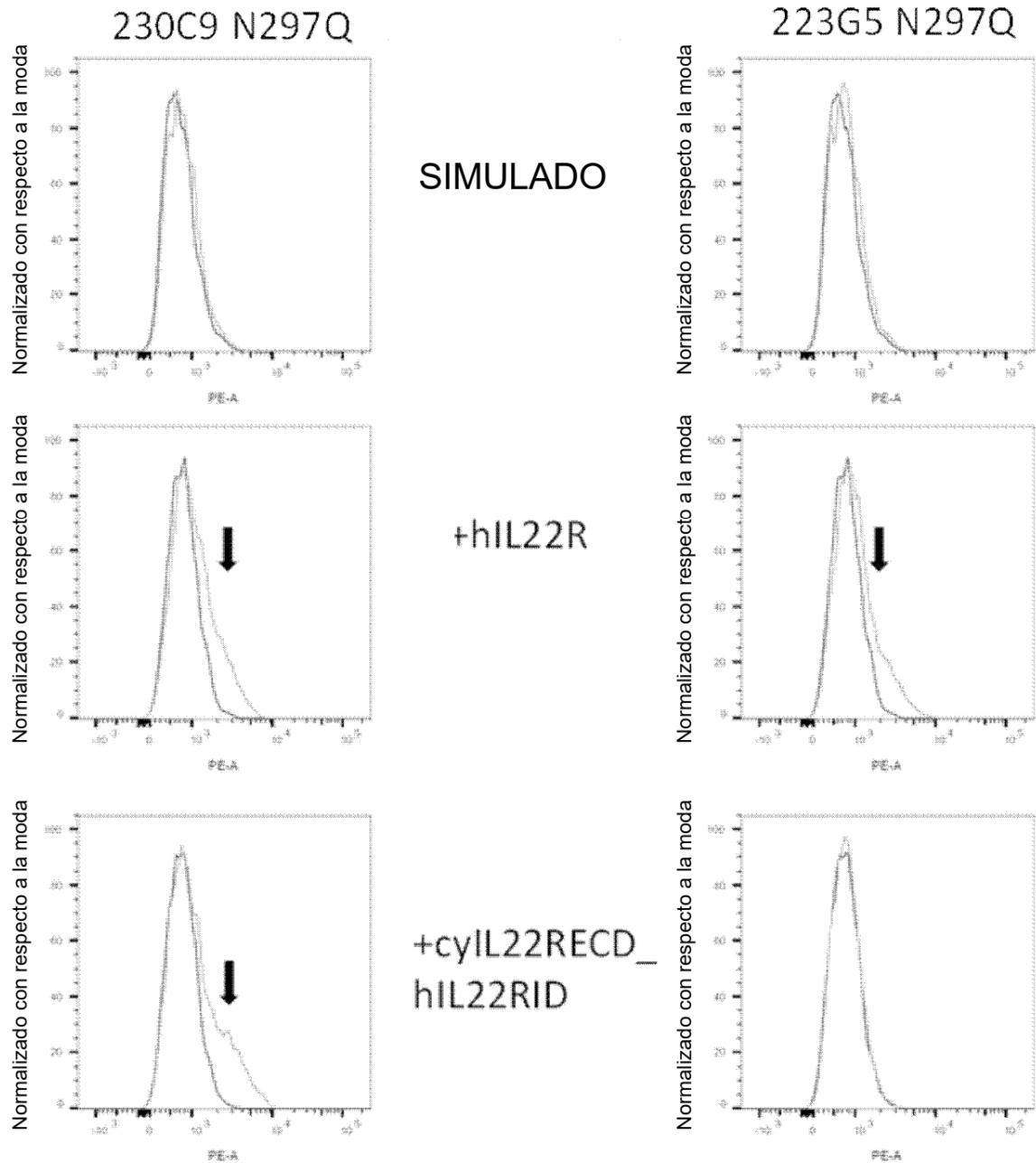
Fig. 11

Fig. 12

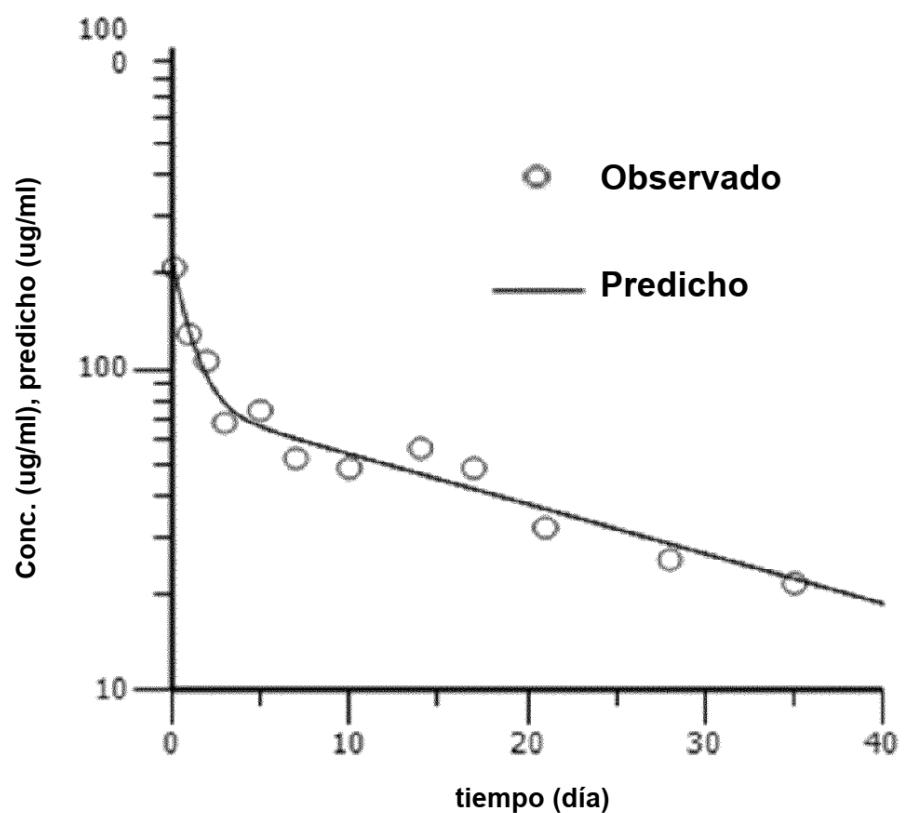


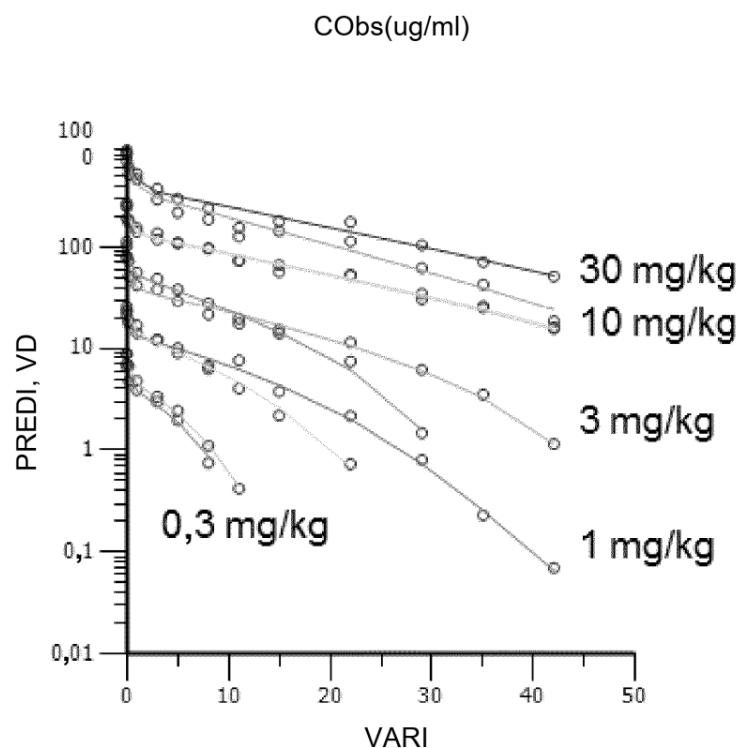
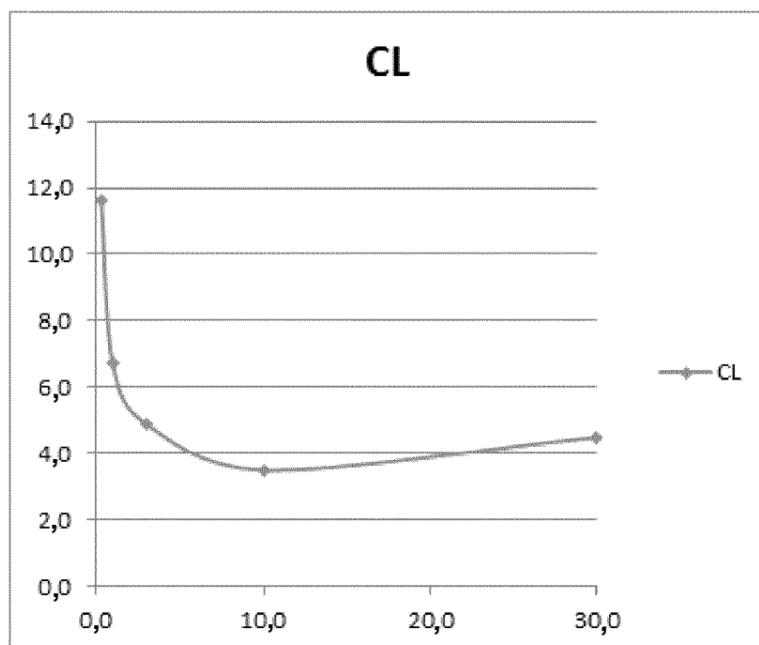
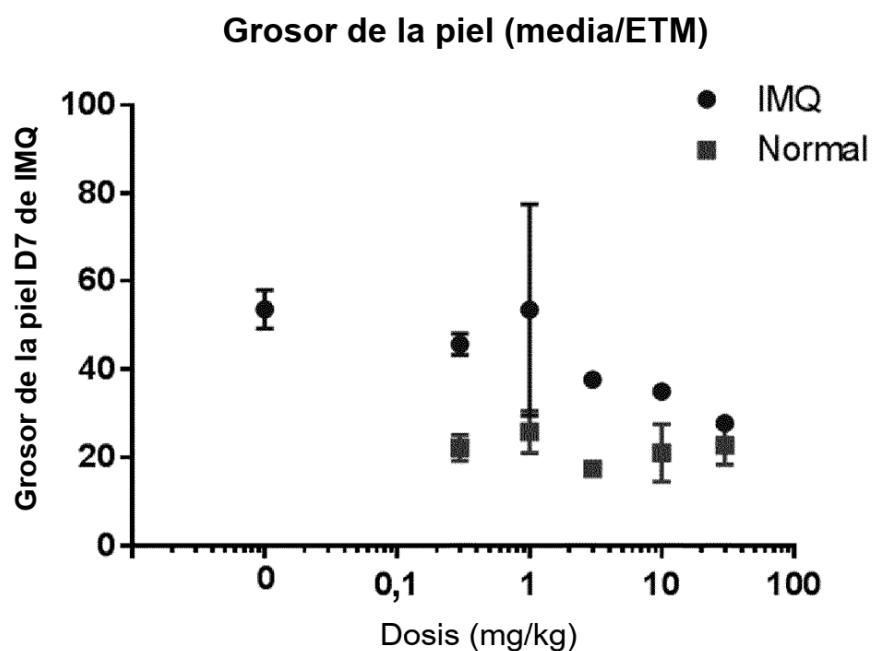
Fig. 13**A****B**

Fig. 14

A



B

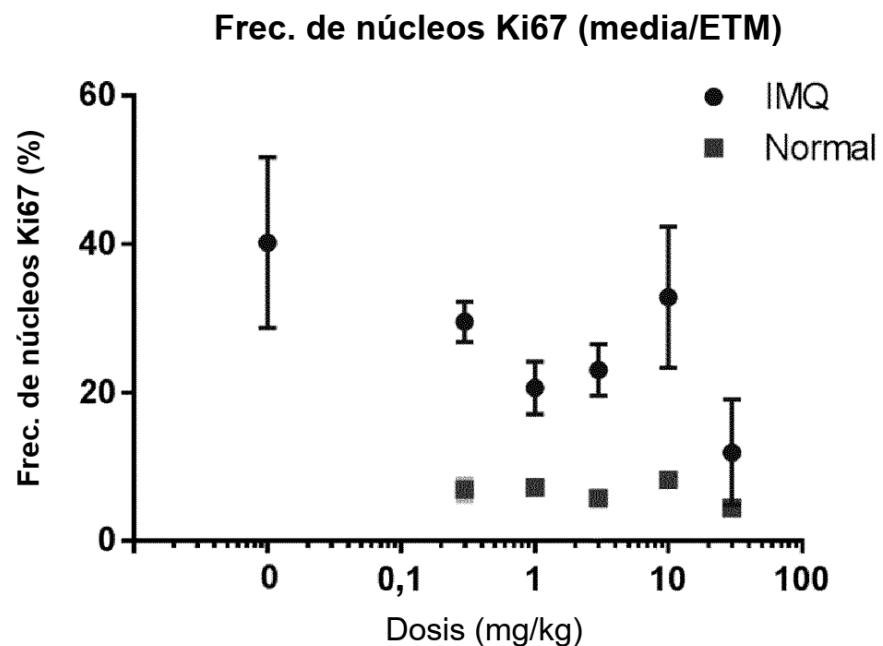
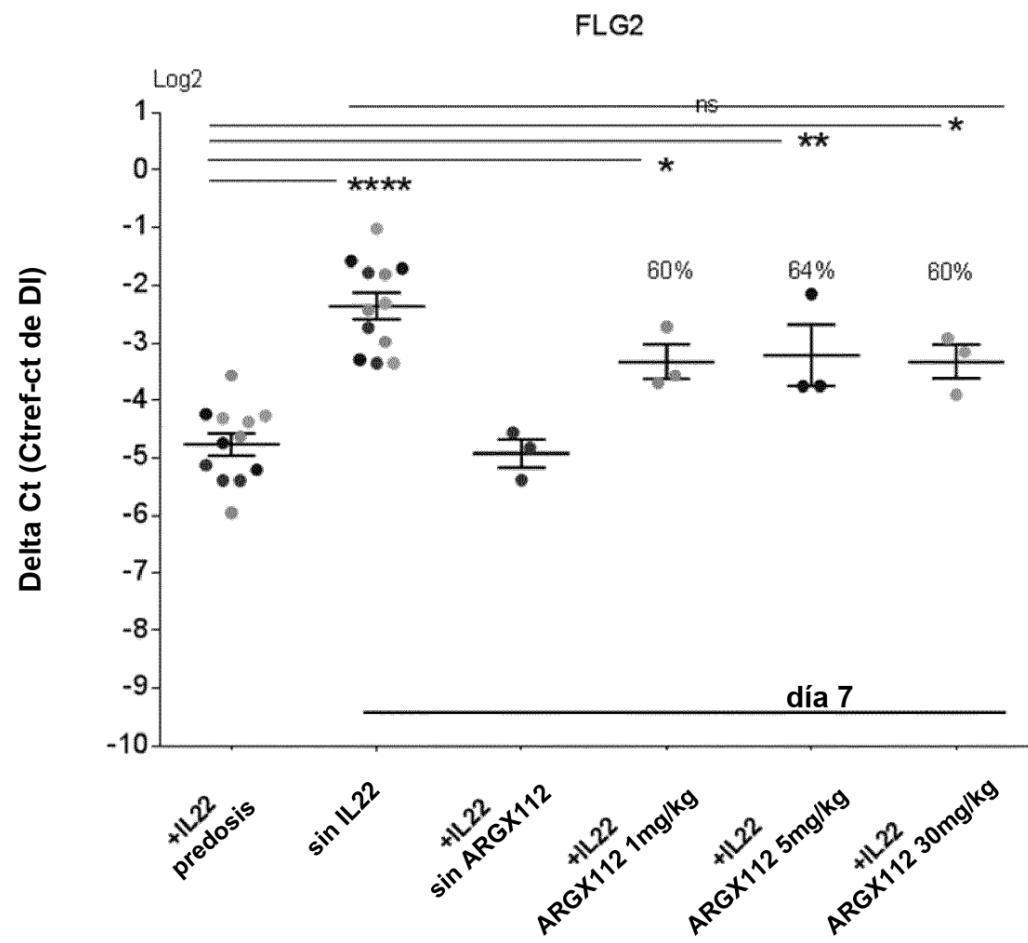


Fig. 15

ES 2 903 412 T3

Fig. 16

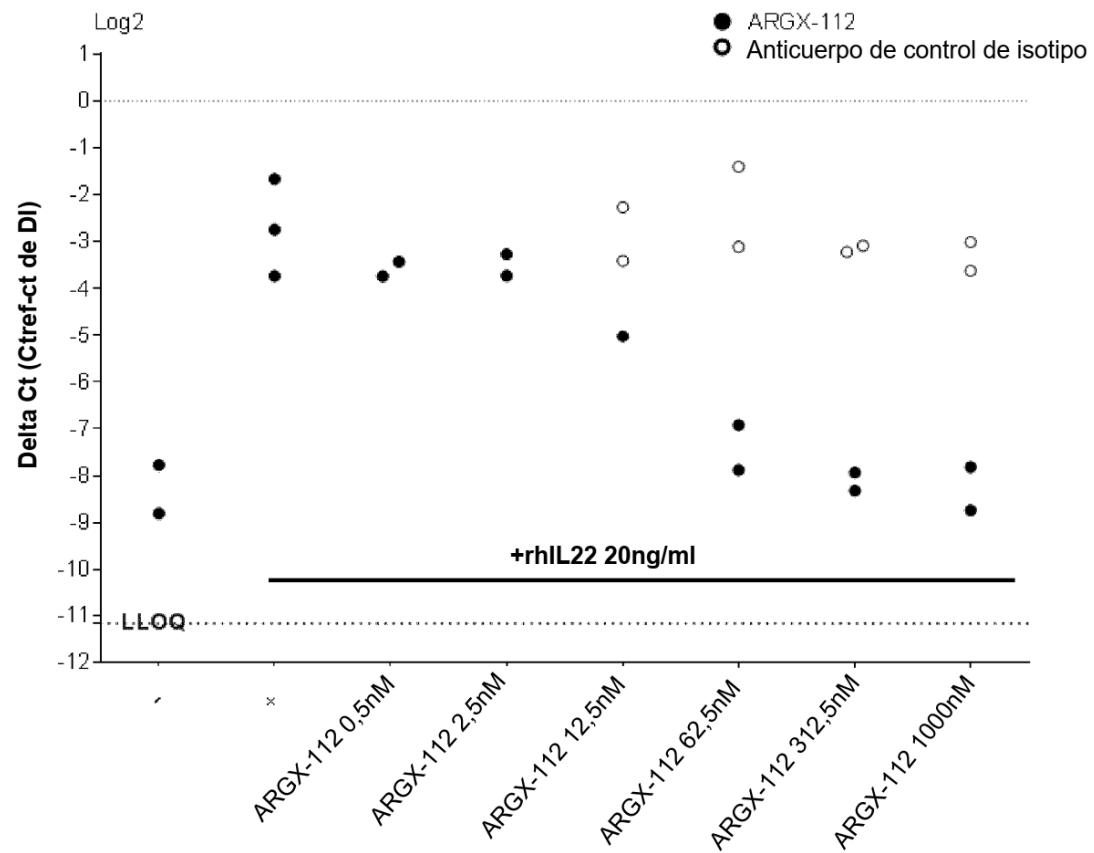


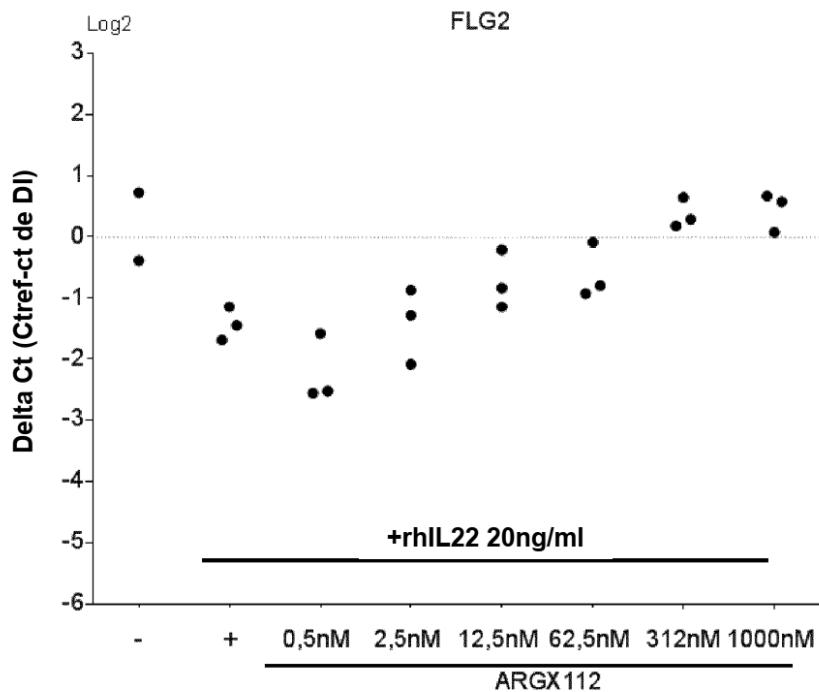
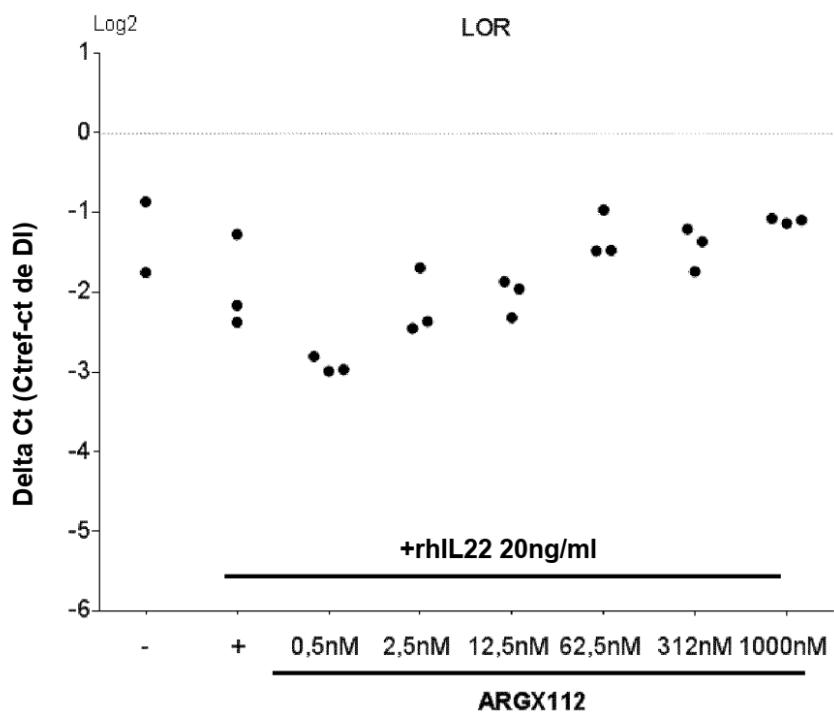
Fig. 17**A****B**

Fig. 18

