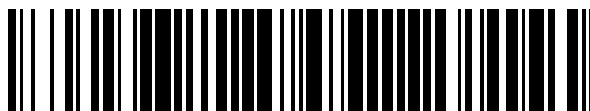


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 837**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08714211 .3**
96 Fecha de presentación: **21.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2059534**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

54 Título: **Anticuerpos anti-IL-23p19 diseñados por ingeniería genética**

30 Prioridad:
23.02.2007 US 891409 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2012

73 Titular/es:
**Merck Sharp & Dohme Corp.
126 East Lincoln Avenue
Rahway NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:
**PRESTA, Leonard G.;
BEYER, Brian M.;
INGRAM, Richard N.;
ORTH, Peter y
LIU, Yan-Hui**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 388 837 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-23p19 diseñados por ingeniería genética.

La presente divulgación se refiere, en líneas generales, a anticuerpos específicos contra interleuquina-23p19 (IL-23p19) y usos de los mismos. Más específicamente, la divulgación se refiere a anticuerpos humanizados que reconocen IL-23p19 humana y modulan su actividad, particularmente en trastornos inflamatorios, autoinmunes y proliferativos.

Antecedentes de la invención

El sistema inmune funciona protegiendo a los individuos de agentes infecciosos, por ejemplo, bacterias, organismos multicelulares, y virus, así como de cánceres. Este sistema incluye varios tipos de células linfoides y mieloides tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas (CD), eosinófilos, células T, células B, y neutrófilos. Estas células linfoides y mieloides a menudo producen proteínas de señalización conocidas como citoquinas. La respuesta inmune incluye inflamación, es decir, la acumulación de células inmunes sistémicamente o en una localización particular del cuerpo. En respuesta a un agente infeccioso o sustancia foránea, las células inmunes secretan citoquinas que, a su vez, modulan la proliferación, desarrollo, diferenciación, o migración de las células inmunes. La respuesta inmune puede producir consecuencias patológicas, por ejemplo, cuando implica inflamación excesiva, como en los trastornos autoinmunes (véase, por ejemplo, Abbas y col. (eds.) (2000) Cellular and Molecular Immunology, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA; Oppenheim y Feldmann (eds.) (2001) Cytokine Reference, Academic Press, San Diego, CA; von Andrian y Mackay (2000) New Engl. J. Med. 343:1020-1034; Davidson y Diamond (2001) New Engl. J. Med. 345:340-350).

La interleuquina-12 (IL-12) es una molécula heterodimérica compuesta por las subunidades p35 y p40. Los estudios han indicado que la IL-12 desempeña una tarea crítica en la diferenciación de células T vírgenes en los linfocitos T CD4⁺ tipo 1 auxiliares que secretan IFN γ . Se ha demostrado también que la IL-12 es esencial para respuesta inmunes dependientes de células T e inflamatorias *in vivo*. Véase, por ejemplo, Cua y col. (2003) Nature 421:744-748. El receptor de IL-12 está compuesto por las subunidades IL-12 β 1 e IL-12 β 2.

La interleuquina-23 (IL-23) es una citoquina heterodimérica compuesta por dos subunidades, p19 que es única para IL-23, y p40, que está compartida con IL-12. La subunidad p19 está estructuralmente relacionada con IL-6, el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), y la subunidad p35 de IL-12. La IL-23 media la señalización uniéndose a un receptor heterodimérico, compuesto por IL-23R e IL-12 β 1, que está compartida por el receptor de IL-12. Varios estudios previos demostraron que las consecuencias de una deficiencia genética en p40 (ratón p40 knockout; ratón p40KO) eran más graves que las encontradas en un ratón p35KO. Algunos de estos resultados finalmente se explicaron por el descubrimiento de IL-23, y el hallazgo de que p40KO evita la expresión no solamente de IL-12, sino también de IL-23 (véase, por ejemplo, Oppmann y col. (2000) Immunity 13:715-725; Wiekowski y col. (2001) J. Immunol. 166:7563-7570; Parham y col. (2002) J. Immunol. 168:5699-708; Frucht (2002) Sci STKE 2002, E1-E3; Elkins y col. (2002) Infection Immunity 70:1936-1948).

Recientes estudios, a través del uso de ratones p40 KO, han demostrado que el bloqueo tanto de IL-23 como de IL-12 es un tratamiento eficaz para diversos trastornos inflamatorios y autoinmunes. Sin embargo, el bloqueo de IL-12 a través de p40 parece tener diversas consecuencias sistémicas tales como susceptibilidad aumentada a infecciones microbianas oportunistas. Bowman y col. (2006) Curr. Opin. Infect. Dis. 19:245.

Pueden usarse anticuerpos terapéuticos para bloquear la actividad citoquina. La limitación más significativa en el uso de anticuerpos como agente terapéutico *in vivo* es la inmunogenicidad de los anticuerpos. Como la mayoría de los anticuerpos monoclonales se obtienen de roedores, su uso repetido en seres humanos provoca la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo terapéutico. Dicha respuesta inmune provoca una pérdida de eficacia terapéutica como mínimo y una potencial respuesta anafiláctica fatal como máximo. Los esfuerzos iniciales por reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos de roedores implicaron la producción de anticuerpos quiméricos, en los que se fusionaron regiones variables de ratón con regiones constantes humanas. Liu y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-43. Sin embargo, ratones inyectados con híbridos de regiones variables humanas y regiones constantes de ratón desarrollan una fuerte respuesta anti-anticuerpo contra la región variable humana, lo que sugiere que la retención de la región Fv completa de roedor en dichos anticuerpos quiméricos puede aún provocar una inmunogenicidad no deseada en los pacientes.

Generalmente se cree que los bucles de la región determinante de complementariedad (CDR) de los dominios variables comprenden el sitio de unión de moléculas de anticuerpo. Por lo tanto, se intentó el injerto de bucles CDR de roedor en regiones flanqueantes humanas (es decir, la humanización) para minimizar adicionalmente las secuencias de roedores. Jones y col. (1986) Nature 321:522; Verhoeven y col. (1988) Science 239:1534. Sin embargo, los intercambios de bucles CDR aún no producen de forma uniforme un anticuerpo con las mismas propiedades de unión que el anticuerpo de origen. También se requieren cambios en los restos flanqueantes (FR), los restos implicados en el soporte del bucle CDR, en anticuerpos humanizados para conservar la afinidad de unión a antígeno. Kabat y col. (1991) J. Immunol. 147:1709. Aunque se ha informado del uso de injertos de CDR y la conservación de restos flanqueantes en varias construcciones de anticuerpos humanizados, es difícil predecir si una secuencia

particular producirá el anticuerpo con la unión deseada, y a veces las propiedades biológicas. Véase, por ejemplo, Queen y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029, Gorman y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181, y Hodgson (1991) Biotechnology (NY) 9:421-5. Además, la mayoría de los estudios usaron diferentes secuencias humanas para las secuencias animales variables ligera y pesada, haciendo que fuera cuestionable la naturaleza predictiva de dichos estudios. Se han usado secuencias de anticuerpos conocidos o, más típicamente, aquellas de anticuerpos que tienen estructuras conocidas de rayos X, anticuerpos NEW y KOL. Véase, por ejemplo, Jones y col., *supra*; Verhoeyen y col., *supra*; y Gorman y col., *supra*. Se ha informado de la información de secuencia exacta para unas pocas construcciones humanizadas. Se describen anticuerpos diseñados por ingeniería genética ejemplares contra IL-23p19 en las solicitudes de patente provisional de Estados Unidos de cesión común N° 60/891.409 y 60/891.413 transferidas legalmente (ambas presentadas el 23 de febrero de 2007), en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2007/0009526 y 2007/0048315, y en las publicaciones de patente internacional N° WO 2007/076524, WO 2007/024846 y WO 2007/147019.

Existe la necesidad de anticuerpos anti-huLL-23p19 para su uso, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos inflamatorios, autoinmunes, y proliferativos. Preferiblemente, dichos anticuerpos se diseñan por ingeniería genética para introducir secuencias humanas de la línea germinal para reducir la inmunogenicidad en sujetos humanos, por ejemplo, en las regiones flanqueantes. Preferiblemente, dichos anticuerpos tendrán elevada afinidad por huLL-23p19 y se unirán con elevada especificidad a huLL-23p19.

Sumario de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones. La presente descripción proporciona compuestos de unión, tales como anticuerpos o un fragmento de los mismos, incluyendo anticuerpos recombinantes humanizados o quiméricos, que se unen a IL-23p19 humana, que comprenden un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene al menos una, dos o tres CDR seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 32-46. En una realización, el compuesto de unión de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende al menos un CDRL1 seleccionado entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 32-36; al menos un CDRL2 seleccionado entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 37-41; y al menos un CDRL3 seleccionado entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 42-46.

En una realización, el compuesto de unión comprende un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene al menos una, dos o tres CDR seleccionadas entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 15-31. En una realización, el compuesto de unión de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende al menos un CDRH1 seleccionado entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 15-19; al menos un CDRH2 seleccionado entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 20-26; y al menos un CDRH3 seleccionado entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 27-31.

En otras realizaciones, el compuesto de unión de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en los dos párrafos precedentes.

En algunas realizaciones, el compuesto de unión comprende una región flanqueante, en la que la secuencia de aminoácidos de la región flanqueante es toda o sustancialmente toda la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana.

En algunas realizaciones, los dominios variables de cadena ligera y/o cadena pesada comprenden una variante de una o más de las CDR. En diversas realizaciones, el dominio variante comprende hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos aminoácidos modificados de forma conservativa con relación a la secuencia de los respectivos números de SEC ID. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se proporcionan en la Tabla 1.

En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena ligera comprende los restos 1-108 de la SEC ID N° 14 o una variante del mismo. En algunas realizaciones, el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por los restos 1-116 de las SEC ID N° 6-8, tales como la SEC ID N° 6, SEC ID N° 7 o SEC ID N° 8. En diversas realizaciones, el dominio variable variante comprende hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 ó 50 o más restos aminoácidos modificados de forma conservativa con relación a la secuencia de los respectivos números de SEC ID. En otra realización adicional, el compuesto de unión comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, descritos en este párrafo.

En una realización, el compuesto de unión comprende una secuencia de cadena ligera de la SEC ID N° 14 y/o un secuencia de cadena pesada seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 6-8.

En otras realizaciones, el compuesto de unión de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que consta esencialmente de los restos 1-108 de la SEC ID N° 14, y/o un dominio variable de cadena pesada, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que consta esencialmente de una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por los restos 1-116 de las SEC ID N° 6-8, tal como la SEC ID N° 6, SEC ID N° 7 o SEC ID N° 8.

En otras realizaciones, el compuesto de unión de la presente descripción comprende un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene al menos un 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de homología de secuencia con los restos 1-108 de la SEC ID N° 14, y/o un dominio variable de cadena pesada, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene al menos un 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de homología de secuencia con una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por los restos 1-116 de la SEC ID N° 6-8, tal como la SEC ID N° 6, SEC ID N° 7 o SEC ID N° 8.

En una realización, el compuesto de unión de la presente descripción se une a IL-23p19 humana (SEC ID N° 47) en un epítoto que comprende los restos 20-30, o los restos 82-110, o ambos. En otra realización, el compuesto de unión a IL-23p19 se une a un epítoto que comprende algunos o todos los restos K20, T23, W26, S27, P30, E82, S95, L96, L97, P98, D99, P101, G103, Q104, H106, A107 y L110, y opcionalmente los restos L24, L85, T91, S100 y V102. En diversas realizaciones, el epítoto para un anticuerpo de interés se determina obteniendo una estructura cristalina de ratos X de un complejo anticuerpo:antígeno y determinando cuales de los restos en IL-23p19 están dentro de una distancia especificada de restos en el anticuerpo de interés, en el que la distancia especificada es, por ejemplo, 4 Å o 5 Å. En algunas realizaciones, el epítoto se define como un tramo de 11 o más restos aminoacídicos contiguos a lo largo de la secuencia de IL-23p19 en la que al menos el 30%, 40%, 45%, 50% ó 54% de los restos están dentro de la distancia especificada del anticuerpo.

En una realización, la descripción se refiere a anticuerpos que son capaces de bloquear la unión de un compuesto de unión de la presente descripción a IL-23 humana en un ensayo de bloqueo cruzado. En otra realización, la descripción se refiere a compuestos de unión que son capaces de bloquear la actividad mediada por IL-23, incluyendo dichas actividades, aunque sin limitación, la unión a su receptor y la promoción de la proliferación o supervivencia de células T_H17.

En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada humana γ 1, γ 2, γ 3, o γ 4 o una variante de la misma. En diversas realizaciones, la región constante de cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera humana lambda o kappa.

En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado o completamente humano o un fragmento del mismo. La presente invención también contempla que el fragmento de unión a antígeno sea un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el grupo compuesto por, por ejemplo, Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, y un diacuerpo.

La presente descripción abarca un procedimiento para suprimir una respuesta inmune en un sujeto humano que comprende administrar a un sujeto que lo necesite un anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) específico para IL-23 en una cantidad suficiente para bloquear la actividad biológica de IL-23. En algunas realizaciones, el anticuerpo específico para IL-23 es el anticuerpo humanizado o quimérico. En realizaciones adicionales, la respuesta inmune es una respuesta inflamatoria, incluyendo artritis, psoriasis, y enfermedad inflamatoria del intestino. En otras realizaciones, la respuesta inmune es una respuesta autoinmune, incluyendo esclerosis, uveítis, lupus sistémico eritematoso y diabetes. En otra realización, el sujeto tiene cáncer y la respuesta inmune es una respuesta Th17.

La presente descripción también contempla administrar un agente inmunosupresor o anti-inflamatorio adicional. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención puede estar en una composición farmacéutica que comprende el compuesto de unión, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la composición farmacéutica comprende adicionalmente un agente inmunosupresor o anti-inflamatorio.

La presente invención abarca un ácido nucleico aislado que codifica la secuencia polipeptídica de una realización de anticuerpo del compuesto de unión de la presente invención. El ácido nucleico puede estar en un vector de expresión unido de forma funcional a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transfectada con el vector. También se abarca una célula huésped que comprende el vector, y un procedimiento para producir un polipéptido, que comprende cultivar la célula huésped en condiciones en las que la secuencia de ácido nucleico se expresa, produciendo de este modo el polipéptido, y recuperar el polipéptido de la célula huésped o el medio.

En diversas realizaciones, la invención se refiere al uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de trastornos incluyendo, aunque sin limitación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune, cáncer, enfermedad infecciosa (por ejemplo, infección bacteriana, micobacteriana, vírica o fúngica, incluyendo infecciones crónicas), artritis, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, uveítis, lupus sistémico eritematoso y diabetes.

En otras realizaciones, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para tratar trastornos incluyendo, aunque sin limitación, enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune, cáncer, enfermedad infecciosa (por ejemplo, infección bacteriana, micobacteriana, vírica o fúngica, incluyendo infecciones crónicas), artritis, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, uveítis, lupus sistémico eritematoso y diabetes.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o composición farmacéutica de

la presente invención, induce un periodo prolongado de remisión de los síntomas de enfermedad en un sujeto, de modo que puede ampliarse el intervalo de dosificación a mucho más de la semi-vida del compuesto de unión en el sujeto, por ejemplo en el tratamiento de una enfermedad remitente-recurrente. En diversas realizaciones, el intervalo entre una administración y otra es de 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30 semanas o más. En otras realizaciones, una única administración es suficiente para evitar recidivas permanentemente.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra comparaciones de las secuencias clonales de ratón del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-IL-23p19 humana. Se proporcionan las secuencias para los clones m1A11, m11C1, m5F5, m21D1, m13B8, h13B8a, h13B8b y h13B8c. Las CDR están indicadas. En ambas figuras, un prefijo "m" indica un anticuerpo murino y una "h" indica un anticuerpo humanizado. Los sufijos "a", "b" y "c" se refieren a variantes de secuencia del dominio variable de cadena pesada 13B8 humanizado, como se analiza a continuación en mayor detalle.

La Figura 2 muestra comparaciones de secuencias clonales de ratón del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-IL-23p19 humana. Se proporcionan las secuencias para los clones m1A11, m11C1, m5F5, m21D1, m13B8, h13B8. Las CDR están indicadas.

Descripción detallada

Como se usa en este documento, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como "un", "una", y "el", "la", incluyen sus correspondientes referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. La siguiente Tabla 7 proporciona una lista de identificadores de secuencia usados en esta solicitud. La citación de las referencias en este documento no se entiende como una admisión de que algo de lo anterior es técnica previa pertinente, ni constituye ninguna admisión en cuanto a los contenidos o fecha de estas publicaciones o documentos.

I. Definiciones

"Actividad proliferativa" abarca una actividad que promueve, que es necesaria para, o que está específicamente asociada con, por ejemplo, la división celular normal, así como cáncer, tumores, displasia, transformación celular, metástasis, y angiogénesis.

"Administración" y "tratamiento", aplicado a un animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano, o fluido biológico, se refiere al contacto de un agente exógeno farmacéutico, terapéutico, de diagnóstico, o composición con el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano, o fluido biológico. "Administración" y "tratamiento" pueden referirse, por ejemplo, a procedimientos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación, y experimentales. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. "Administración" y "tratamiento" también significan tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, mediante una composición reactiva, de diagnóstico, de unión, o por otra célula. "Tratamiento", aplicado a un ser humano, sujeto veterinario, o de investigación, se refiere a tratamiento terapéutico, profiláctico o medidas preventivas, para aplicaciones de investigación y de diagnóstico. "Tratamiento" aplicado a un ser humano, sujeto veterinario, o de investigación, o célula, tejido, u órgano, abarca el contacto de un agente con un sujeto animal, una célula, tejido, compartimiento fisiológico, o fluido fisiológico. "El tratamiento de una célula" también abarca situaciones en las que el agente contacta con el receptor de IL-23 (heterodímero IL-23R/IL-12Rbeta1), por ejemplo, en la fase fluida o fase coloidal, pero también situaciones en las que el agonista o antagonista no contacta con la célula o el receptor.

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo que muestre la actividad biológica deseada. Por tanto, se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos completamente humanos, etc. siempre que muestren la actividad biológica deseada.

Como se usa en este documento, los términos "fragmento de unión a IL-23p19", "fragmento de unión del mismo" o "fragmento de unión a antígeno del mismo" abarcan un fragmento o un derivado de un anticuerpo que aún retiene sustancialmente su actividad biológica de inhibir la actividad de IL-23p19. Por lo tanto, el término "fragmento de anticuerpo" o fragmento de unión a IL-23p19 se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región variable o de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, por ejemplo, sc-Fv; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Típicamente, un fragmento de unión o derivado retiene al menos el 10% de su actividad inhibidora de IL-23p19. Preferiblemente, un fragmento de unión o derivado retiene al menos el 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ó 100% (o más) de su actividad inhibidora de IL-23p19, aunque será útil cualquier fragmento de unión con suficiente afinidad para ejercer el efecto biológico deseado. También se pretende que un fragmento de unión a IL-23p19 pueda incluir variantes que tienen sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad biológica.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una

población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único epítoto antigénico. En contraste, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) típicamente incluyen una multitud de anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) diferentes epítopes. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe entenderse como que requiere producción del anticuerpo mediante ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col. (1975) *Nature* 256: 495, o pueden prepararse por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas mágicas de anticuerpos usando las técnicas descritas en Clackson y col. (1991) *Nature* 352: 624-628 y Marks y col. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales de este documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison y col. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855.

Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, se unen covalentemente dos o más regiones V_H con un enlazador peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones V_H de un anticuerpo de dominio bivalente puede estar dirigido a los mismos o a diferentes antígenos.

Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión a antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades de antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos (véase a continuación).

Como se usa en este documento, el término anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L , que posibilita que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun (1994) *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315.

Los anticuerpos monoclonales de este documento también incluyen anticuerpos camélidos de dominio sencillo. Véase, por ejemplo, Muyldermans y col. (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Reichmann y col. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:25; documento WO 94/04678; documento WO 94/25591; patente de Estados Unidos N° 6.005.079. En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos de dominio sencillo que comprende dos dominios V_H con modificaciones de modo que se formen anticuerpos de dominio sencillo.

Como se usa en este documento, el término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L o V_L - V_H). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Holliger y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448. Para una revisión de variantes de anticuerpo diseñadas por ingeniería genética, véase en líneas generales Holliger y Hudson (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. El prefijo "hum", "hu" o "h" se añade a las denominaciones del clon de anticuerpo cuando es necesario distinguir los anticuerpos humanizados (por ejemplo, hum13B8) de los anticuerpos parentales de roedor (por ejemplo, 13B8 de ratón, o m13B8). Las formas humanizadas de anticuerpos de roedor generalmente comprenderán las mismas secuencias CDR de los anticuerpos parentales de roedor, aunque pueden incluirse ciertas sustituciones de aminoácidos para aumentar la afinidad, aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado, o por otras razones.

- Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos con regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar funciones efectoras alteradas. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.624.821; el documento WO2003/086310; el documento WO2005/120571; el documento WO2006/0057702; Presta (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656. Dicha modificación puede usarse para potenciar o suprimir diversas reacciones del sistema inmune, con posibles efectos beneficiosos en diagnóstico y terapia. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, detenciones e inserciones), glucosilación o desglucosilación, y añadir múltiples Fc. Los cambios al Fc también pueden alterar la semi-vida de los anticuerpos en anticuerpos terapéuticos, y una semi-vida más larga provocaría una dosificación menos frecuente, con la concomitante comodidad aumentada y uso disminuido de material. Véase, Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol.116:731 a 734-35.
- El término "anticuerpo completamente humano" se refiere a un anticuerpo que comprende solamente secuencias de la proteína inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas murinas de carbohidrato si se producen en un ratón, en una célula de ratón, o en un híbrido derivado de una célula de ratón. Asimismo, "anticuerpo de ratón" se refiere a un anticuerpo que comprende solamente secuencias de inmunoglobulina de ratón. Un anticuerpo completamente humano puede generarse en un ser humano, en un animal transgénico que tiene secuencias de inmunoglobulina humana de la línea germinal, por presentación en fagos u otros procedimientos de biología molecular.
- Como se usa en este documento, el término "región hipervariable" se refiere a los restos aminoacídicos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende los restos aminoacídicos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los restos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de cadena ligera y los restos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de cadena pesada (Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada (Chotia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917)). Como se usa en este documento, el término restos "flanqueantes" o "FR" se refiere a aquellos restos del dominio variable diferentes a los restos de la región hipervariable definidos en este documento como restos CDR. La numeración de restos anterior se refiere al sistema de numeración de Kabat y no corresponde necesariamente en detalle a la numeración de secuencia en la lista de secuencias adjunta.
- "Compuesto de unión" se refiere a una molécula, molécula pequeña, macromolécula, polipéptido, anticuerpo o fragmento o análogo del mismo, o receptor soluble, capaz de unirse a una diana. "Compuesto de unión" también puede referirse a un complejo de moléculas, por ejemplo, un complejo no covalente, a una molécula ionizada, y a una molécula modificada covalente o no covalentemente, por ejemplo, modificada por fosforilación, acilación, reticulación, ciclación, o escisión limitada, que es capaz de unirse a una diana. Cuando se usa con referencia a anticuerpos, el término "compuesto de unión" se refiere tanto a anticuerpos como a fragmentos de unión a antígeno de los mismos. "Unión" se refiere a una asociación de la composición de unión con una diana, donde la asociación provoca la reducción en el movimiento browniano normal de la composición de unión, en casos en los que la composición de unión puede disolverse o suspenderse en solución. "Composición de unión" se refiere a una molécula, por ejemplo, un compuesto de unión, en combinación con un estabilizador, excipiente, sal, tampón, disolvente, o aditivo, capaz de unirse a una diana.
- "Variantes modificadas de forma conservativa" o "sustitución conservativa" se refiere a sustituciones de aminoácidos conocidas para los especialistas en esta técnica y que pueden hacerse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante, incluso en regiones esenciales del polipéptido. Dichas sustituciones ejemplares se hacen preferiblemente de acuerdo con las expuestas en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1

Sustituciones Conservativas Ejemplares de Aminoácidos	
Resto original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala

(continuación)

Sustituciones Conservativas Ejemplares de Aminoácidos	
Resto original	Sustitución conservativa
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Además, los especialistas en esta técnica reconocen que, en general, sustituciones individuales de aminoácidos en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica. Véase, por ejemplo, Watson y col. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág. 224 (4ª Edición).

La expresión "consta esencialmente de", o variaciones tales como "constan esencialmente de" o "que consta esencialmente de", como se usa en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, indica la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos indicados, y la inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a la de los elementos indicados, que no cambia de forma material las propiedades básicas o nuevas del régimen de dosificación especificado, procedimiento, o composición. Como ejemplo no limitante, un compuesto de unión que consta esencialmente de una secuencia de aminoácidos indicada también puede incluir uno o más aminoácidos, incluyendo sustituciones de uno o más restos aminoacídicos, que no afectan de forma material a las propiedades del compuesto de unión.

"Cantidad eficaz" abarca una cantidad suficiente para mejorar o prevenir un síntoma o signo de la afección médica. Cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar la diagnosis. Una cantidad eficaz para un paciente o sujeto veterinario particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se está tratando, la salud global del paciente, el procedimiento, vía y dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.888.530. Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o el protocolo de dosificación que evite los efectos secundarios o efectos tóxicos significativos. El efecto provocará una mejora de una medición o parámetro de diagnóstico en al menos un 5%, habitualmente en al menos el 10%, más habitualmente al menos el 20%, mucho más habitualmente al menos el 30%, preferiblemente al menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, mucho más preferiblemente al menos el 60%, idealmente al menos el 70%, más idealmente al menos el 80%, y mucho más idealmente al menos el 90%, donde el 100% se define como el parámetro de diagnóstico mostrado por un sujeto normal. Véase, por ejemplo, Maynard y col. (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, RU.

"Afección inmune" o "trastorno inmune" abarca, por ejemplo, inflamación patológica, un trastorno inflamatorio, y un trastorno o enfermedad autoinmune. "Afección inmune" también se refiere a infecciones, infecciones persistentes, y afecciones proliferativas, tales como cáncer, tumores, y angiogénesis, incluyendo infecciones, tumores, y cánceres que resisten a su erradicación por el sistema inmune. "Afección cancerosa" incluye, por ejemplo, cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis, y afecciones precancerosas tales como displasia.

"Trastorno inflamatorio" significa un trastorno o afección patológica en que la patología está provocada, en conjunto o en parte, por, por ejemplo, un cambio en la cantidad, un cambio en la velocidad de migración, o un cambio en la activación, de células del sistema inmune. Las células del sistema inmune incluyen, por ejemplo, células T, células B,

monocitos o macrófagos, células presentadoras de antígeno (APC), células dendríticas, microglia, células NK, células NKT, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, o cualquier otra célula asociada específicamente con la inmunología, por ejemplo, células endoteliales o epiteliales productoras de citoquinas.

5 Una "célula productora de IL-17" significa una célula T que no es una célula T tipo TH1 clásica o célula T tipo TH2 clásica, conocida como células T_H17. Las células T_H17 se analizan en mayor detalle en Cua y Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559; Tato y O'Shea (2006) Nature 441:166-168; Iwakura e Ishigame (2006) J. Clin. Invest. 116:1218-1222. "Célula productora de IL-17" también significa una célula T que expresa un gen o polipéptido de la Tabla 10B de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2004/0219150 (por ejemplo, proteína P sensible a mitógenos; quimioquina ligando 2; interleuquina-17 (IL-17); factor de transcripción relacionado con RAR; y/o supresor 3 de la señalización de citoquinas), donde la expresión con tratamiento por un agonista de IL-23 es mayor que con tratamiento con un agonista de IL-12, donde "mayor que" se define a continuación. La expresión con un agonista de IL-23 es habitualmente al menos 5 veces mayor, típicamente al menos 10 veces mayor, más típicamente al menos 15 veces mayor, mucho más típicamente al menos 20 veces mayor, preferiblemente al menos 25 veces mayor, y mucho más preferiblemente al menos 30 veces mayor, que con tratamiento con IL-12. La expresión puede medirse, por ejemplo, con tratamiento de una población sustancialmente pura de células productoras de IL-17. Una respuesta Th17 es una respuesta inmune en que está potenciada la actividad y/o proliferación de células Th17, típicamente acoplada con una respuesta Th1 reprimida.

Además, "célula productora de IL-17" incluye una célula progenitora o precursora que está comprometida, en una vía de desarrollo celular o diferenciación celular, a diferenciarse en una célula productora de IL-17, como se ha definido anteriormente. Una célula progenitora o precursora a la célula productora de IL-17 puede encontrarse en un ganglio linfático de drenaje (GLD). Además, "célula productora de IL-17" abarca una célula productora de IL-17, como se ha definido anteriormente, que, por ejemplo, se ha activado, por ejemplo, mediante un éster de forbol, ionóforo, y/o carcinógeno, se ha diferenciado adicionalmente, almacenado, congelado, desecado, inactivado, parcialmente degradado, por ejemplo, por apoptosis, proteólisis, u oxidación lipídica, o modificado, por ejemplo, por tecnología recombinante.

Como se usa en este documento, el término "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico que está identificada y separada de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está habitualmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente en la forma o entorno en que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas, por lo tanto, se distinguen de la molécula de ácido nucleico que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida de forma funcional en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

Un ácido nucleico está "unido de forma funcional" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder de secreción está unido de forma funcional al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido de forma funcional a una secuencia codificante si está situado de modo que facilite la traducción. Generalmente, "unido de forma funcional" significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o enlazadores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa en este documento, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable y todas estas denominaciones incluyen descendencia. Por tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados a partir de la misma independientemente de la cantidad de transferencias. También se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica de forma precisa en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica determinada en la célula originalmente transformada. Cuando se pretendan denominaciones distintas, quedará claro a partir del contexto.

Como se usa en este documento, "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento o técnica en que cantidades insignificantes de un trozo específico de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican como se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.683.195. Generalmente, tiene que estar disponible la información de secuencia desde los extremos de la región de interés o más allá, de modo que pueden diseñarse cebadores oligonucleotídicos; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas del

molde a amplificar. Los nucleótidos terminales 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede usarse para amplificar secuencias específicas de ARN, secuencias específicas de ADN de un ADN genómico total, y ADNc transcrito a partir de un ARN celular total, secuencias bacteriófagas o plasmídicas, etc. Véase, en líneas generales, Mullis y col. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.) Como se usa en este documento, se considera que la PCR es un ejemplo, aunque no el único, de un procedimiento de reacción de la polimerasa del ácido nucleico para amplificar una muestra de ensayo de ácido nucleico que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como cebador y una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar una parte específica de ácido nucleico.

Como se usa en este documento, el término "secuencia de la línea germinal" se refiere a una secuencia de secuencias de ADN de inmunoglobulina no reordenadas, incluyendo secuencias de la línea germinal de roedores (por ejemplo, ratón) y humana. Puede usarse cualquier fuente adecuada de ADN de inmunoglobulina no reordenado. Las secuencias humanas de la línea germinal pueden obtenerse, por ejemplo, de las bases de datos de línea germinal JOINSOLVER® en el sitio web del National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases del United States National Institutes of Health. Las secuencias de ratón de la línea germinal pueden obtenerse, por ejemplo, como se describe en Giudicelli y col. (2005) Nucleic Acids Res. 33:D256-D261.

Para examinar el grado de inhibición de la actividad IL-23, por ejemplo, se tratan muestras o ensayos que comprenden, por ejemplo, una proteína, gen, célula, u organismo dado, con un agente activador o inhibidor potencial y se comparan con muestras de control sin el agente. A las muestras de control, es decir, no tratadas con agente, se les asigna un valor de actividad relativa del 100%. La inhibición se consigue cuando el valor de actividad relativo al control es de aproximadamente el 90% o menos, típicamente del 85% o menos, más típicamente del 80% o menos, mucho más típicamente del 75% o menos, generalmente del 70% o menos, más generalmente del 65% o menos, mucho más generalmente del 60% o menos, típicamente del 55% o menos, habitualmente del 50% o menos, más habitualmente del 45% o menos, mucho más habitualmente del 40% o menos, preferiblemente del 35% o menos, más preferiblemente del 30% o menos, aún más preferiblemente del 25% o menos, y mucho más preferiblemente menor del 25%. La activación se consigue cuando el valor de actividad relativo al control es de aproximadamente el 110%, generalmente de al menos el 120%, más generalmente de al menos el 140%, más generalmente de al menos el 160%, a menudo de al menos el 180%, más a menudo de al menos 2 veces, mucho más a menudo de al menos 2,5 veces, habitualmente de al menos 5 veces, más habitualmente de al menos 10 veces, preferiblemente de al menos 20 veces, más preferiblemente de al menos 40 veces, y mucho más preferiblemente más de 40 veces mayor.

Los criterios de valoración en activación o inhibición pueden controlarse del siguiente modo. La activación, inhibición, y respuesta al tratamiento, por ejemplo, de una célula, fluido fisiológico, tejido, órgano, y sujeto animal o humano, puede controlarse por un criterio de valoración. El criterio de valoración puede comprender una cantidad o porcentaje predeterminado de, por ejemplo, un indicio de inflamación, oncogenicidad, o desgranulación o secreción celular, tal como la liberación de una citoquina, oxígeno tóxico, o una proteasa. El criterio de valoración puede comprender, por ejemplo, una cantidad predeterminada de flujo o transporte de iones; migración celular; adhesión celular; proliferación celular; potencial de metástasis; diferenciación celular; y cambio en el fenotipo, por ejemplo, cambio en la expresión de genes relacionados con la inflamación, apoptosis, transformación, ciclo celular, o metástasis (véase, por ejemplo, Knight (2000) Ann. Clin. Lab. Sci. 30:145-158; Hood y Cheresch (2002) Nature Rev. Cancer 2:91-100; Timme y col. (2003) Curr. Drug Targets 4:251-261; Robbins y Itzkowitz (2002) Med. Clin. North Am. 86:1467-1495; Grady y Markowitz (2002) Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 3:101-128; Bauer, y col. (2001) Glia 36:235-243; Stanimirovic y Satoh (2000) Brain Pathol. 10:113-126).

Un criterio de valoración de inhibición es generalmente un 75% del control o menos, preferiblemente un 50% del control o menos, más preferiblemente un 25% del control o menos, y mucho más preferiblemente un 10% del control o menos. Generalmente, un criterio de valoración de activación es al menos un 150% del control, preferiblemente al menos dos veces el control, más preferiblemente al menos cuatro veces el control, y mucho más preferiblemente al menos 10 veces el control.

"Molécula pequeña" se define como una molécula con un peso molecular que es de menos de 10 kDa, típicamente de menos de 2 kDa, y preferiblemente de menos de 1 kDa. Las moléculas pequeñas incluyen, aunque sin limitación, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que contienen un componente inorgánico, moléculas que comprenden un átomo radiactivo, moléculas sintéticas, miméticos de péptidos, y miméticos de anticuerpos. Como agente terapéutico, una molécula pequeña puede ser menos permeable para las células, menos susceptible a la degradación, y menos apta para provocar una respuesta inmune que moléculas grandes. Se describen moléculas pequeñas, tales como miméticos peptídicos de anticuerpos y citoquinas, así como toxinas de molécula pequeña. Véase, por ejemplo, Casset y col. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 307:198-205; Muyldermans (2001) J. Biotechnol. 74:277-302; Li (2000) Nat. Biotechnol. 18:1251-1256; Apostolopoulos y col. (2002) Curr. Med. Chem. 9:411-420; Monfardini y col. (2002) Curr. Pharm. Des. 8:2185-2199; Domingues y col. (1999) Nat. Struct. Biol. 6:652-656; Sato y Sone (2003) Biochem. J. 371: 603-608; patente de Estados Unidos N° 6.326.482.

Se une "específicamente" o "selectivamente", cuando se refiere a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno, u otro par de unión, indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros agente biológicos. Por tanto, en condiciones designadas, un ligando específico se une a un receptor particular y no se une en un grado significativo a otras proteínas presentes en la muestra. Como se

usa en este documento, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido *que comprende* una secuencia dada (en este caso IL-23p19) si se une a polipéptidos que comprenden la secuencia de IL-23p19 pero no se une a proteínas que carecen de la secuencia de IL-23p19. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende IL-23p19 puede unirse a una forma marcada con FLAG® de IL-23p19 pero no se unirá a otras proteínas marcadas con FLAG®.

El anticuerpo, o composición de unión derivada del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, del procedimiento contemplado, se une a su antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor, preferiblemente al menos diez veces mayor, más preferiblemente al menos 20 veces mayor, y mucho más preferiblemente al menos 100 veces mayor que la afinidad con antígenos no relacionados. En una realización preferida, el anticuerpo tendrá una afinidad que es mayor de aproximadamente 10^9 litros/mol, determinada, por ejemplo, por análisis de Scatchard. Munsen y col. (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239.

Como se usa en este documento, el término "agente inmunomodulador" se refiere a agentes naturales o sintéticos que suprimen o modulan una respuesta inmune. La respuesta inmune puede ser una respuesta humoral o celular. Los agentes inmunomoduladores abarcan agentes inmunosupresores o anti-inflamatorios.

"Agentes inmunosupresores", "fármacos inmunosupresores", o "inmunosupresores" como se usan en este documento son agentes terapéuticos que se usan en terapia inmunosupresora para inhibir o evitar la actividad del sistema inmune. Clínicamente se usan para prevenir el rechazo de órganos y tejidos trasplantados (por ejemplo, médula ósea, corazón, riñón, hígado), y/o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o enfermedades que son muy probablemente de origen autoinmune (por ejemplo, artritis reumatoide, miastenia grave, lupus sistémico eritematoso, colitis ulcerosa, esclerosis múltiple). Los fármacos inmunosupresores pueden clasificarse en cuatro grupos: glucocorticoides citostáticos; anticuerpos (incluyendo modificadores de respuesta biológica o DMARD); fármacos que actúan sobre inmunofilinas; otros fármacos, incluyendo agentes quimioterapéuticos conocidos usados en el tratamiento de trastornos proliferativos. Para esclerosis múltiple, en particular, los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse junto con una nueva clase de agentes terapéuticos tipo proteína de unión a mielina, conocidos como copaxones.

"Agentes anti-inflamatorios" o "fármacos anti-inflamatorios", se usan para representar agentes terapéuticos tanto esteroideos como no esteroideos. Los esteroideos, también conocidos como corticosteroides, son fármacos que se parecen mucho al cortisol, una hormona producida de forma natural por las glándulas suprarrenales. Los esteroideos se usan como tratamiento principal para ciertas afecciones inflamatorias, tales como: vasculitis sistémica (inflamación de los vasos sanguíneos); y miositis (inflamación del músculo). Los esteroideos también podrían usarse selectivamente para tratar afecciones inflamatorias tales como: artritis reumatoide (artritis inflamatoria crónica en articulaciones en ambos lados del cuerpo); lupus sistémico eritematoso (una enfermedad generalizada causada por una función anormal del sistema inmune); síndrome de Sjögren (trastorno crónico que causa sequedad ocular y sequedad en la boca).

Los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, habitualmente abreviados como AINE, son fármacos con efectos analgésicos, antipiréticos y anti-inflamatorios - reducen el dolor, la fiebre y la inflamación. El término "no esteroideo" se usa para distinguir estos fármacos de los esteroideos, que (entre una amplia gama de otros efectos) tienen una acción anti-inflamatoria de depresión eicosanoide similar. Los AINE están generalmente indicados para el alivio sintomático de las siguientes afecciones: artritis reumatoide; osteoartritis; artropatías inflamatorias (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter); gota aguda; dismenorrea; dolor óseo metastásico; cefalea y migraña; dolor postoperatorio; dolor de leve a moderado debido a inflamación y lesión tisular; pirexia; y cólico renal. Los AINE incluyen salicilatos, ácido arilalcanoico, ácidos 2-arilpropiónicos (profenos), ácidos N-arilantranílicos (ácidos fenámicos), oxicams, coxibs, y sulfonanilidas.

II. General

La presente invención proporciona anticuerpos anti-IL-23 diseñados por ingeniería genética y usos de los mismos para tratar trastornos inflamatorios, autoinmunes, y proliferativos.

Varias citoquinas tienen una tarea en la patología o reparación de trastornos neurológicos. La IL-6, la IL-17, el interferón-gamma (IFN γ , IFN- γ), y el factor estimulador de colonias de granulocitos (GM-CSF) se han asociado con la esclerosis múltiple. Matusiewicz y col. (1999) *Multiple Sclerosis* 5:101-104; Lock y col. (2002) *Nature Med.* 8:500-508. La IL-1alfa, la IL-1beta, y el factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF-beta1) desempeñan una tarea en la ALS, la enfermedad de Parkinson, y la enfermedad de Alzheimer. Hoozemans y col. (2001) *Exp. Gerontol.* 36:559-570; Griffin y Mrak (2002) *J. Leukocyte Biol.* 72:233-238; Ilzecka y col. (2002) *Cytokine* 20:239-243. El TNF-alfa, la IL-1beta, la IL-6, la IL-8, el interferón-gamma, y la IL-17 parecen modular la respuesta a isquemia cerebral. Véase, por ejemplo, Kostulas y col. (1999) *Stroke* 30:2174-2179; Li y col. (2001) *J. Neuroimmunol.* 116:5-14. El factor de crecimiento celular del endotelio vascular (VEGF) está asociado con la ALS. Cleveland y Rothstein (2001) *Nature* 2:806-819.

Los trastornos inflamatorios del intestino, por ejemplo, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la enfermedad celíaca, y el síndrome del intestino irritable, están mediados por células del sistema inmune y por citoquinas. Por ejemplo, la enfermedad de Crohn está asociada con un aumento de IL-12 e IFN γ , mientras que la colitis ulcerosa está

asociada con un aumento de IL-5, IL-13, y factor de crecimiento transformante-beta (TGFbeta). La expresión de IL-17 también puede aumentar en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Véase, por ejemplo, Podolsky (2002) *New Engl. J. Med.* 347:417-429; Bouma y Strober (2003) *Nat. Rev. Immunol.* 3:521-533; Bhan y col. (1999) *Immunol. Rev.* 169:195-207; Hanauer (1996) *New Engl. J. Med.* 334:841-848; Green (2003) *The Lancet* 362:383-391; McManus (2003) *New Engl. J. Med.* 348:2573-2574; Horwitz y Fisher (2001) *New Engl. J. Med.* 344:1846-1850; Andoh y col. (2002) *Int. J. Mol. Med.* 10:631-634; Nielsen y col. (2003) *Scand. J. Gastroenterol.* 38:180-185; Fujino y col. (2003) *Gut* 52:65-70.

El receptor de IL-23 es un complejo heterodimérico de las subunidades IL-23R e IL-12Rβ1. Véase Parham y col. (2000) *J. Immunol.* 168:5699. El receptor de IL-12 es un complejo de las subunidades IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2. Véase Presky y col. (1996) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 93:14002. IL-23R se ha implicado como factor genérico crítico en los trastornos inflamatorios del intestino enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Duerr y col. (2006) *Scienceexpress* 26-octubre-2006:1. Un estudio de genoma completo halló que el gen para IL-23R estaba altamente asociado con la enfermedad de Crohn, confiriendo una variante codificante poco común (Arg381 Gln) una fuerte protección contra la enfermedad. Esta asociación genética confirma los hallazgos biológicos previos (Yen y col. (2006) *J. Clin. Investigation* 116:1218) que sugerían que la IL-23 y su receptor son dianas prometedoras para nuevos agentes terapéuticos enfocados a tratar la IBD.

Las enfermedades inflamatorias de la piel, las articulaciones, el SNC, así como los trastornos proliferativos, provocan respuestas inmunes similares, por tanto el bloqueo de IL-23 debería proporcionar la inhibición de estos trastornos inflamatorios mediados por el sistema inmune, sin comprometer la capacidad del huésped de combatir las infecciones sistémicas. Antagonizar la IL-23 debería aliviar la inflamación asociada con la enfermedad inflamatoria del intestino, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la artritis reumatoide, la artritis psoriásica, la psoriasis, la espondilitis anquilosante, y la dermatitis atópica. El uso de inhibidores de IL-23 también proporcionará la inhibición de trastornos proliferativos, por ejemplo, cáncer y trastornos autoinmunes, por ejemplo, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, y SLE. Pueden encontrarse descripciones de IL-23 en estos diversos trastornos en las siguientes solicitudes PCT publicadas: WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; y WO 01/18051. Los inhibidores de IL-23 también pueden encontrar uso en el tratamiento de infecciones, incluyendo infecciones crónicas, tales como infecciones bacterianas, micobacterianas, víricas y fúngicas.

La subunidad p19 de la IL-23 es un miembro de la familia de 'cadena larga' de citoquinas hematopoyéticas (Oppmann y col. (2000) *supra*) y comprende cuatro α-hélices empaquetadas llamadas A, B, C y D, con una topología arriba-arriba-abajo-abajo. Las 4 hélices están conectadas por 3 bucles polipeptídicos. Los bucles A-B y C-D están modelados para ser relativamente largos ya que conectan hélices paralelas. El corto bucle B-C conecta las hélices B y C antiparalelas. La subunidad p19 de la IL-23 es un miembro de la familia de IL-6 de citoquinas helicoides. Esta familia de citoquinas se une a sus receptores afines a través de tres epítopes conservados (sitio I, II y III; Bravo y Heath (2000) *EMBO J.* 19:2399-2411). La subunidad p19 interacciona con tres subunidades de receptor de citoquinas para formar el complejo de señalización competente. Cuando se expresa en una célula, la subunidad p19 primero forma un complejo con la subunidad p40, que comparte con IL-12. Como se ha indicado anteriormente, el complejo p19p40 se secreta de la célula en forma de una proteína heterodimérica y se llama IL-23. Véase, por ejemplo, Oppmann y col., *supra*. El complejo receptor celular necesario para transducir la señal de IL-23 consta de dos miembros de las subunidades del receptor de señalización toll de la familia IL-6/IL-12 de citoquinas, el IL-23R específico de IL-23 (véase, por ejemplo, Parham y col., *supra*) y el IL-12Rβ1, que está compartido con IL-12.

Aportes en la base estructural del reconocimiento citoquina de 'cadena larga'/receptor han demostrado que aunque se ocultan grandes áreas de la superficie proteica en la formación de complejos citoquina - receptor, la afinidad de la interacción está dominada por unos pocos restos aminoacídicos a menudo estrechamente agrupados que forman un 'punto caliente' energético en el centro de la superficie de contacto de unión. La identidad de los restos que dominan la energía de unión de una gran superficie de contacto proteína-proteína se ha llamado 'epítipo funcional'. La afinidad de la interacción (y por tanto la especificidad biológica) se define por consiguiente por la complementariedad estructural de los epítipes funcionales del ligando y el receptor. Estudios detallados de mutagénesis han demostrado que los restos más significativos que componen los epítipes funcionales de las citoquinas y los receptores son contactos hidrófobos que implican cadenas laterales no polares tales como triptófano, los componentes alifáticos de cadenas laterales no polares o la estructura polipeptídica. El núcleo 'no polar' está rodeado por un halo de restos polares de menor importancia para la energía de unión. Estudios cinéticos indican que la tarea principal de los epítipes funcionales es estabilizar la interacción proteína-proteína disminuyendo la velocidad de disociación del complejo. Se ha sugerido que el contacto inicial entre la citoquina y el receptor está dominado por difusión aleatoria o 'balanceo' de las superficies proteicas que produce muchos contactos inestables. El complejo se estabiliza después cuando los epítipes funcionales del receptor y el ligando se acoplan. Véase, por ejemplo, Bravo y Heath, *supra*.

III. Generación de anticuerpos específicos para IL-23

Puede usarse cualquier procedimiento adecuado para generar anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, puede inmunizarse a un destinatario con una forma reticulada o no reticulada (por ejemplo, de origen natural) del heterodímero IL-23, o un fragmento del mismo. Puede usarse cualquier procedimiento adecuado de inmunización. Dichos procedimientos pueden incluir adyuvantes, otros inmunoestimuladores, inmunizaciones de refuerzo repetidas, y el uso de una o más vías de inmunización.

Puede usarse cualquier fuente adecuada de IL-23 como inmunógeno para la generación del anticuerpo no humano, específico para la subunidad p19, de las composiciones y procedimientos descritos en este documento. Dichas formas incluyen, aunque sin limitación, la proteína completa, incluyendo heterodímeros reticulados y de origen natural, péptidos(s), y epítopes, generados a través de medios de degradación recombinante, sintética, química o enzimática conocidos en la técnica.

Puede usarse cualquier forma del antígeno para generar el anticuerpo que es suficiente para generar un anticuerpo biológicamente activo. Por tanto, el antígeno productor puede ser un único epítope, múltiples epítopes, o la proteína completa sola o en combinación con uno o más agentes potenciadores de inmunogenicidad conocidos en la técnica. El antígeno productor puede ser una proteína de longitud completa aislada, una proteína de superficie celular (por ejemplo, inmunizando con células transfectadas con al menos una parte del antígeno), o una proteína soluble (por ejemplo, inmunizando con solamente la parte del dominio extracelular de la proteína). El antígeno puede producirse en una célula genéticamente modificada. El ADN que codifica el antígeno puede ser genómico o no genómico (por ejemplo, ADNc) y codifica al menos una parte del dominio extracelular. Como se usa en este documento, el término "parte" se refiere a la cantidad mínima de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea apropiado, para constituir un epítope inmunogénico del antígeno de interés. Puede emplearse cualquier vector genético adecuado para la transformación de las células de interés, incluyendo, aunque sin limitación, vectores adenovirales, plásmidos, y vectores no virales, tales como lípidos catiónicos.

Puede usarse cualquier procedimiento adecuado para producir un anticuerpo con las propiedades biológicas deseadas para inhibir la IL-23. Es deseable preparar anticuerpos monoclonales (mAb) a partir de diversos huéspedes mamíferos, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos, etc. Puede encontrarse una descripción de las técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales en, por ejemplo, Stites y col. (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y referencias citadas en ese documento; Harlow y Lane (1988) ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CSH Press; Goding (1986) MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY. Por tanto, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales por una diversidad de técnicas familiares para los investigadores especializados en la técnica. Típicamente, se immortalizan esplenocitos de un animal inmunizado con un antígeno deseado, habitualmente por fusión con una célula de mieloma. Véase Kohler y Milstein (1976) Eur. J. Immunol. 6:511-519. Los procedimientos alternativos de immortalización incluyen transformación con virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus, u otros procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Doyle y col. (eds. 1994 y suplementos periódicos) CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley and Sons, Nueva York, NY. Las colonias que surgen de las células immortalizadas individuales se exploran para la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas para el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células puede potenciarse por diversas técnicas, incluyendo inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado. Como alternativa, pueden aislarse secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo explorando una biblioteca de ADN de células B humanas de acuerdo, por ejemplo, con el protocolo general descrito por Huse y col. (1989) Science 246:1275-1281.

Otras técnicas adecuadas implican la selección de bibliotecas de anticuerpos en fagos o vectores similares. Véase, por ejemplo, Huse y col. *supra*; y Ward y col. (1989) Nature 341:544-546. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención pueden usarse con o sin modificación, incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcarán uniendo, de forma covalente o no covalente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación y se presentan de forma extensiva en la bibliografía tanto científica como de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminescentes, partículas magnéticas, y similares. Las patentes que muestran el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de Estados Unidos N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Además, pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes, véase Cabilly patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Queen y col. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033; o prepararse en ratones transgénicos, véase Mendez y col. (1997) Nature Genetics 15:146-156. Véanse también las tecnologías Abgenix y Medarex.

Pueden producirse anticuerpos o composiciones de unión contra fragmentos predeterminados de IL-23 por inmunización de animales con conjugados del polipéptido, fragmentos, péptidos, o epítopes con proteínas vehículo. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de células que secretan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos pueden explorarse para la unión a IL-23 normal o defectuoso. Estos anticuerpos monoclonales habitualmente se unirán con al menos una K_d de aproximadamente 1 μ M, más habitualmente de al menos aproximadamente 300 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 300 pM, 100 pM, 30 pM o mejor, habitualmente determinada por ELISA. Los anticuerpos no humanos adecuados también pueden identificarse usando los ensayos biológicos descritos en los Ejemplos 5 y 6, a continuación.

Se depositó un hibridoma que expresa el anticuerpo 13B8 en cumplimiento del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC - Manassas, Virginia, EEUU) el 17 de agosto de 2006 con el número de acceso PTA-7803.

IV. Humanización de anticuerpos específicos para IL-23

Puede usarse cualquier anticuerpo no humano adecuado como fuente para la región hipervariable. Las fuentes para anticuerpos no humanos incluyen, aunque sin limitación, murinos, lagomorfos (incluyendo conejos), bovinos, y primates. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de la región hipervariable del receptor están remplazados por restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad, y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región flanqueante (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se remplazan por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo de la actividad biológica deseada. Para detalles adicionales, véase Jones y col. (1986) Nature 321:522-525; Reichmann y col. (1988) Nature 332:323-329; y Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596.

Se han descrito procedimientos para diseñar de forma recombinante anticuerpos, por ejemplo, por Boss y col. (patente de Estados Unidos N° 4.816.397), Cabilly y col. (patente de Estados Unidos N° 4.816.567) Law y col. (publicación de solicitud de patente europea N° EP438310A1) y Winter (patente europea N° EP239400B1).

Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IL-23 humanizado introduciendo cambios apropiados de nucleótidos en el ADN del anticuerpo anti-IL-23 humanizado, o por síntesis peptídica. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en, y/o sustituciones de, restos dentro de la secuencia de aminoácidos mostrada para el anticuerpo anti-IL-23 humanizado. Cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución se hace para llegar a la construcción final, con la condición de que la construcción final tenga las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-IL-23 humanizado, tal como cambiando la cantidad o posición de los sitios de glucosilación.

Un procedimiento útil para la identificación de ciertos restos o regiones del polipéptido del anticuerpo anti-IL-23p19 humanizado que son localizaciones preferidas para mutagénesis, se llama "mutagénesis por rastreo de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science 244: 1081-1085. Aquí, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) y se remplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno IL-23. Los restos aminoácídicos que muestran sensibilidad funcional a las sustituciones entonces se refinan introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminada, no tiene que predeterminarse la naturaleza de la mutación *per se*. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis por rastreo de Ala o aleatoria en el codón o región diana y las variantes expresadas del anticuerpo anti-IL-23p19 humanizado se exploran para la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxil-terminales que varían en longitud desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones dentro de la secuencia de un único resto aminoácídico o múltiples restos aminoácídicos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen el anticuerpo anti-IL-23 humanizado con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a una marca epitópica. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo anti-IL-23 humanizado incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo anti-IL-23 humanizado de una enzima o un polipéptido que aumenta la semi-vida en suero del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácídico en la molécula del anticuerpo anti-IL-23p19 humanizado eliminado y un resto diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen los bucles hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en la FR.

Otro tipo de variante a nivel aminoácido del anticuerpo altera el patrón original de glucosilación del anticuerpo. Por alterar se entiende eliminar uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de los anticuerpos es típicamente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. Glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse por la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glucosilación ligados a O).

Otro tipo más de variante a nivel aminoácido es la sustitución de restos para proporcionar mayor estabilidad química del anticuerpo humanizado final. Por ejemplo, puede cambiarse un resto de asparagina (N) para reducir el potencial de formación de isoaspartato en cualquier secuencia NG dentro de una CDR de roedor. Puede existir un problema similar en una secuencia DG. Reissner y Aswad (2003) Cell. Mol. Life Sci. 60:1281. La formación de isoaspartato puede debilitar o anular completamente la unión de un anticuerpo a su antígeno diana. Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 a 734. En una realización, la asparagina se cambia a glutamina (Q). Además, los restos de metionina en CDR de roedor pueden cambiarse para reducir la posibilidad de que el azufre de la metionina se oxide, lo que podría reducir la afinidad de unión al antígeno y también contribuir a la heterogeneidad molecular en la preparación final de anticuerpos. *Id.* En una realización, la metionina se cambia a alanina (A). Los anticuerpos con dichas sustituciones se exploran posteriormente para asegurar que las sustituciones no disminuyen la afinidad de unión a IL-23p19 a niveles inaceptables.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado específico para IL-23 se preparan por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, aunque sin limitación, aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis con casete de una variante preparada previamente o una versión no variante del anticuerpo anti-IL-23p19 humanizado.

Habitualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IL-23 humanizado tendrán una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado original de la cadena pesada o ligera, más preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, y mucho más preferiblemente al menos un 95, 98, ó 99%. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en este documento como el porcentaje de restos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos de anti-IL-23 humanizado, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ninguna extensión, delección, o inserción N-terminal, C-terminal, o interna en la secuencia del anticuerpo se interpretará como influyente en la identidad u homología de secuencia.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA, e IgE. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. Puede usarse cualquier isotipo de IgG, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄. También se contemplan variantes de los isotipos IgG. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo. La optimización de las secuencias del dominio constante necesarias para generar la actividad biológica deseada se consigue fácilmente explorando los anticuerpos en los ensayos biológicos descritos a continuación.

Asimismo, puede usarse cualquier clase de cadena ligera en las composiciones y procedimientos de este documento. Específicamente, son útiles kappa, lambda, o variantes de las mismas en las presentes composiciones y procedimientos.

Puede usarse cualquier parte adecuada de las secuencias CDR del anticuerpo no humano. Las secuencias CDR pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o delección de al menos un resto, de modo que la secuencia CDR sea distinta de la secuencia de anticuerpo humano y no humano empleada. Se contempla que dichas mutaciones sean mínimas. Típicamente, al menos el 75% de los restos del anticuerpo humanizado corresponderá a los de los restos CDR no humanos, más del 90%, y muy preferiblemente más del 95%.

Puede usarse cualquier parte adecuada de las secuencias FR del anticuerpo humano. Las secuencias FR pueden mutagenizarse por sustitución, inserción o delección de al menos un resto de modo que la secuencia FR sea distinta de la secuencia de anticuerpo humano y no humano empleada. Se contempla que dichas mutaciones sean mínimas. Típicamente, al menos el 75% de los restos del anticuerpo humanizado corresponderá a los de los restos FR humanos, más a menudo el 90%, y muy preferiblemente más del 95, 98, ó 99%.

Los restos CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición de secuencia convencional de Kabat. Kabat y col. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. Las SEC ID N° 1-5 muestran las secuencias del dominio variable de cadena pesada de diversos anticuerpos de ratón anti-IL-23p19 humana, y las SEC ID N° 9-13 representan las secuencias del dominio variable de cadena ligera. Las Fig. 1 y 2 proporcionan alineaciones de secuencia de dominios variables de cadena pesada y ligera de los diversos anticuerpos de la presente invención. Las CDR se indican en las figuras, y las secuencias CDR individuales están cada una representada con Identificadores de Secuencia únicos indicados en la Tabla 7.

Se proporcionan formas humanizadas del anticuerpo 13B8. La secuencia de cadena ligera humanizada de 13B8 (con la región constante kappa) se proporciona en la SEC ID N° 14, y el dominio variable de cadena ligera comprende los restos 1-108 de esa secuencia. Se proporcionan tres versiones de la secuencia de cadena pesada humanizada de 13B8 (con regiones constantes γ) en las SEC ID N° 6-8, y el dominio variable de cadena pesada comprende los restos 1-116 de esas secuencias. Las variantes de cadena pesada de 13B8 se ilustran en la Tabla 2, con las diferencias respecto a la secuencia parental indicadas en negrita. La Met (M) se modificó a Lys (K) para evitar el

potencial de oxidación del resto y la inactivación del anticuerpo. La sustitución de AQKLQ para NEMFE es un remplazo de la secuencia CDR murina con la secuencia humana de la línea germinal procedente de la región flanqueante humana seleccionada para humanizar el anticuerpo.

Tabla 2

Variantes de CDRH2 del anticuerpo 13B8		
Anticuerpo	Secuencia CDRH2	SEC ID Nº
m13B8, h13B8-a	QIFPASGSADYNEMFEG	24
h13B8-b	QIFPASGSADYNEKFEG	25
h13B8-c	QIFPASGSADYAQLQG	26

5

Las formas humanizadas de los otros anticuerpos descritos en este documento pueden crearse simplemente sustituyendo las CDR parentales del anticuerpo de roedor en las secuencias de cadena ligera y pesada para el 13B8 humanizado proporcionadas en las SEC ID Nº 14 y 6. Este enfoque muy probablemente es satisfactorio para cadenas de anticuerpo con CDR que tienen elevada homología con las CDR del anticuerpo 13B8, por ejemplo, el clon 11C1 en la cadena pesada y los clones 11C1 y 21D1 en la cadena ligera. Como alternativa, los anticuerpos murinos pueden humanizarse independientemente usando los enfoques expuestos en este documento, por ejemplo en el Ejemplo 2.

10

En una realización, las CDR incluyen variantes de cualquier CDR de secuencia sencilla descrita en este documento (SEC ID Nº 15-46), en que la variante comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones conservativas de aminoácidos relativas a la secuencia descrita, determinadas usando los datos de la Tabla 1.

15

También se contemplan anticuerpos quiméricos. Como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos quiméricos típicos comprenden una parte de la cadena pesada y/o ligera idéntica, u homóloga a, secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada. Véase la patente de Estados Unidos Nº 4.816.567; y Morrison y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855.

20

También son útiles anticuerpos biespecíficos en los presentes procedimientos y composiciones. Como se usa en este documento, el término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo, típicamente un anticuerpo monoclonal, que tiene especificidades de unión por al menos dos epítopes antigénicos diferentes, por ejemplo, IL-23p19 e IL-17. En una realización, los epítopes son del mismo antígeno. En otra realización, los epítopes son de dos antígenos diferentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden producirse de forma recombinante usando la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Milstein y col. (1983) Nature 305: 537-39. Como alternativa, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico. Véase, por ejemplo, Brennan y col. (1985) Science 229:81. Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpo biespecífico. Véase, por ejemplo, Holliger y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48, Gruber y col. (1994) J. Immunol. 152:5368.

25

30

En otras realizaciones más, pueden añadirse diferentes dominios constantes a las regiones V_L y V_H humanizadas proporcionadas en este documento. Por ejemplo, si un uso pretendido particular de un anticuerpo (o fragmento) de la presente invención fuera exigir funciones efectoras alteradas, puede usarse un dominio constante de cadena pesada diferente de IgG1. Aunque los anticuerpos IgG1 proporcionan una larga semi-vida y funciones efectoras, tales como activación del complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, dichas actividades pueden no ser deseables para todos los usos del anticuerpo. En dichos casos, puede usarse un dominio constante de IgG4, por ejemplo.

35

40 V. Actividad biológica del anti-IL-23 humanizado

Los anticuerpos que tienen las características identificadas en este documento como deseables en un anticuerpo anti-IL-23 humanizado pueden explorarse para su actividad biológica inhibidora *in vitro* o la adecuada afinidad de unión. Para explorar anticuerpos que se unen a un epítipo en IL-23 humana (es decir, la subunidad p19) unida por un anticuerpo de interés (por ejemplo, aquellos que bloquean la unión de la citoquina a su receptor), puede realizarse un ensayo rutinario de bloqueo cruzado tal como el descrito en ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Los anticuerpos que se unen al mismo epítipo probablemente efectúan bloqueo cruzado en dichos ensayos, pero no todos los anticuerpos de bloqueo cruzado necesariamente se unirán en precisamente el mismo epítipo, ya que el bloqueo cruzado puede resultar de la impedancia estérica de la unión del anticuerpo por anticuerpos que se unen en epítopes solapantes, o incluso

45

epítopes no solapantes cercanos.

Como alternativa, puede realizarse un mapeo de epítopes, por ejemplo, como se describe en Champe y col. (1995) J. Biol. Chem. 270:1388-1394, para determinar si el anticuerpo se une a un epítope de interés. También puede usarse "mutagénesis por rastreo de alanina", como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science 244: 1081-1085, o alguna otra forma de mutagénesis puntual de restos aminoacídicos en IL-23 humana para determinar el epítope funcional para un anticuerpo anti-IL-23 de la presente invención. Los estudios de mutagénesis, sin embargo, también pueden revelar restos aminoacídicos que son cruciales para la estructura tridimensional global de IL-23 pero que no están directamente implicados en los contactos anticuerpo-antígeno, y por tanto pueden ser necesarios otros procedimientos para confirmar un epítope funcional determinado usando este procedimiento.

El epítope unido por un anticuerpo específico también puede determinarse evaluando la unión del anticuerpo a péptidos que comprenden fragmentos de IL-23p19 humana (SEC ID N° 47). La secuencia de la subunidad p40 de IL-12 e IL-23 se encuentra en el número de acceso a GenBank P29460. Puede sintetizarse una serie de péptidos solapantes que abarcan la secuencia de IL-23p19 y explorarse para la unión, por ejemplo, en un ELISA directo, un ELISA competitivo (donde el péptido se evalúa para su capacidad de evitar la unión de un anticuerpo a IL-23p19 unida a un pocillo de una placa de microtitulación), o en un chip. Dichos procedimientos de exploración de péptidos pueden no ser capaces de detectar algunos epítopes funcionales discontinuos, es decir, epítopes funcionales que implican restos aminoacídicos que no son contiguos a lo largo de la secuencia primaria de la cadena polipeptídica de IL-23p19.

El epítope unido por anticuerpos de la presente invención también puede determinarse por procedimientos estructurales, tales como determinación de la estructura cristalina por rayos X (por ejemplo, documento WO2005/044853), modelado molecular y espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN), incluyendo determinación por RMN de las tasas de intercambio H-D de hidrógenos lábiles de amida en IL-23 cuando están libres y cuando están unidos en un complejo con un anticuerpo de interés (Zinn-Justin y col.(1992) Biochemistry 31:11335-11347; Zinn-Justin y col. (1993) Biochemistry 32:6884-6891).

Con respecto a la cristalografía de rayos X, la cristalización puede conseguirse usando cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, Giege y col. (1994) Acta Crystallogr. D50:339-350; McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189:1-23), incluyendo difusión en microlitos (por ejemplo, Chayen (1997) Structure 5:1269-1274), difusión de vapor en gota colgante (por ejemplo, McPherson (1976) J Biol. Chem. 251:6300-6303), siembra y diálisis. Es deseable usar una preparación de proteínas que tenga una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml y preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. La cristalización puede conseguirse mejor en una solución precipitante que contenga polietilenglicol 1000-20.000 (PEG; peso molecular promedio que varía de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20.000 Da), preferiblemente de aproximadamente 5000 a aproximadamente 7000 Da, más preferiblemente aproximadamente 6000 Da, con concentraciones que varían de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% (p/v). También puede ser deseable incluir un agente estabilizador de proteínas, por ejemplo, glicerol a una concentración que varía de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 20%. También puede ser deseable una sal adecuada, tal como cloruro sódico, cloruro de litio o citrato sódico en la solución precipitante, preferiblemente en una concentración que varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1000 mM. El precipitante está preferiblemente tamponado a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 10,0, a menudo de aproximadamente 7,0 a 8,5, por ejemplo pH 8,0. Los tampones específicos útiles en la solución precipitante pueden variar y son bien conocidos en la técnica. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Tercera ed., (1994) Springer-Verlag, Nueva York. Los ejemplos de tampones útiles incluyen, aunque sin limitación, HEPES, Tris, MES y acetato. Los cristales pueden cultivarse a un amplio intervalo de temperaturas, incluyendo 2°C, 4°C, 8°C y 26°C.

Los cristales anticuerpo:antígeno pueden estudiarse usando técnicas bien conocidas de difracción de rayos X y pueden refinarse usando un software informático tal como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, por ejemplo, Blundell y Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114 y 115, H. W. Wyckoff y col. eds., Academic Press; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2004/0014194), y BUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60; Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter y Sweet, eds.; Roversi y col. (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323).

Pueden obtenerse anticuerpos adicionales que se unen al mismo epítope que un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, explorando anticuerpos creados contra IL-23 para la unión al epítope, o por inmunización de un animal con un péptido que comprende un fragmento de IL-23 humana que comprende la secuencia del epítope. Podría esperarse que anticuerpos que se unen al mismo epítope funcional mostraran actividades biológicas similares, tales como bloqueo de la unión al receptor, y dichas actividades pueden confirmarse por ensayos funcionales de los anticuerpos.

Las afinidades de los anticuerpos (por ejemplo, para IL-23 humana) pueden determinarse usando análisis convencional. Los anticuerpos humanizados preferidos son aquellos que se unen a IL-23p19 humana con un valor de K_d de no más de aproximadamente 1×10^{-7} ; preferiblemente de no más de aproximadamente 1×10^{-8} ; más preferiblemente de no más de aproximadamente 1×10^{-9} ; y mucho más preferiblemente de no más de aproximadamente 1×10^{-10} o incluso 1×10^{-11} M.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos útiles en las presentes composiciones y procedimientos son anticuerpos y fragmentos biológicamente activos. Como se usa en este documento, el término "biólogicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epítipo antigénico deseado y de ejercer directa o indirectamente un efecto biológico. Típicamente, estos efectos resultan del fracaso de IL-23 en unirse a su receptor. Como se usa en este documento, el término "específico" se refiere a la unión selectiva del anticuerpo al epítipo antigénico diana. Los anticuerpos pueden ensayarse para la especificidad de unión comparando la unión a IL-23 con la unión a un antígeno o mezcla de antígeno irrelevante en una serie dada de condiciones. Si el anticuerpo se une a IL-23 al menos 10, y preferiblemente 50 veces más que a un antígeno o mezcla de antígenos irrelevante, entonces se considera que es específico. Un anticuerpo que se une a IL-12 no es un anticuerpo específico para IL-23. Un anticuerpo que "se une específicamente" a IL-23p19 no se une a proteínas que no comprenden las secuencias derivadas de IL-23p19, es decir "especificidad" como se usa en este documento, se refiere a especificidad por IL-23p19, y no por cualquier otra secuencia que pueda estar presente en la proteína en cuestión. Por ejemplo, como se usa en este documento, un anticuerpo que "se une específicamente" a IL-23p19 típicamente se unirá a FLAG®-hIL-23p19, que es una proteína de fusión que comprende IL-23p19 y un péptido marcador FLAG®, pero no se une al péptido marcador FLAG® solo o cuando está fusionado con una proteína diferente de IL-23p19.

El anticuerpo específico para IL-23 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, tal como anticuerpos inhibidores específicos para IL-23p19, puede inhibir su actividad biológica de cualquier modo, incluyendo, aunque sin limitación, la producción de IL-1 β y TNF por macrófagos peritoneales e IL-17 por células T_H17. Véase Langrish y col. (2004) *Immunol. Rev.* 202:96-105. Los anticuerpos anti-IL-23p19 también serán capaces de inhibir la expresión génica de IL-17A, IL-17F, CCL7, CCL17, CCL20, CCL22, CCR1, y GM-CSF. Véase Langrish y col. (2005) *J. Exp. Med.* 201:233-240. El anticuerpo específico para IL-23 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, tal como anticuerpos anti-IL-23p19, también bloqueará la capacidad de IL-23 de potenciar la proliferación o supervivencia de células T_H17. Cua y Kastelein (2006) *Nat. Immunol.* 7:557-559. La actividad inhibidora del anti-IL-23p19 diseñado por ingeniería genética será útil en el tratamiento de trastornos inflamatorios, autoinmunes, y proliferativos. Ejemplos de dichos trastornos se describen en las publicaciones de solicitud de patente PCT WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; y WO 01/18051.

VI. Composiciones farmacéuticas

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyan el anticuerpo contra IL-23p19, se mezcla el análogo o muteína de la citoquina, anticuerpo contra la misma, o ácido nucleico del mismo, con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences y la U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden prepararse mezclando con vehículos, excipientes, o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, pastas, soluciones o suspensiones acuosas. Véase, por ejemplo, Hardman y col. (2001) *Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, y Wilkins, Nueva York, NY; Avis y col. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, y col. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman y col. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY.

La toxicidad y eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpo, administradas solas o en combinación con un agente inmunosupresor, pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción de DL₅₀ a DE₅₀. Se prefieren anticuerpos que muestran elevados índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse para formular una gama de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

El modo de administración no es particularmente importante. Las vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, o intestinal; suministro parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, intradérmicas, subcutáneas, intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares. La administración del anticuerpo usado en la composición farmacéutica o para la práctica del procedimiento de la presente descripción puede realizarse de una diversidad de modos convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o inyección cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, intra-arterial o intravenosa.

Como alternativa, se puede administrar el anticuerpo de una forma local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante inyección del anticuerpo directamente en una articulación artrítica o lesión inducida por el patógeno caracterizada por inmunopatología, a menudo en una formulación de depósito o de liberación sostenida. Además,

puede administrarse el anticuerpo en un sistema de suministro de fármaco dirigido, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de tejido, dirigido, por ejemplo, a la articulación artrítica o lesión inducida por el patógeno caracterizada por inmunopatología. Los liposomas estarán dirigidos a y captados selectivamente por el tejido afectado.

- 5 La selección de un régimen de administración para un agente terapéutico depende de varios factores, incluyendo la tasa de renovación sérica o tisular de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad, y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. Preferiblemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico suministrado al paciente, coherente con un nivel aceptable de efectos secundarios. Por consiguiente, la cantidad de agente biológico suministrado depende, en parte, de la entidad particular y la
- 10 gravedad de la afección que se esté tratando. Hay directrices disponibles sobre la selección de las dosis apropiadas de anticuerpos, citoquinas, y moléculas pequeñas. Véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, RU; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert y col. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom y col. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon y col. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz y col. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh y col. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky y col. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602.

La determinación de la dosis apropiada la hace el médico, por ejemplo, usando parámetros o factores que se sabe o se sospecha en la técnica que afectan al tratamiento o se prevé que afecten al tratamiento. Generalmente, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se aumenta en pequeños incrementos después de ello

20 hasta que se consigue el efecto deseado u óptimo con relación a cualquier efecto secundario negativo. Las mediciones importantes de diagnóstico incluyen aquellas de síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citoquinas inflamatorias producidas. Preferiblemente, un agente biológico que se usará se obtiene sustancialmente de la misma especie que el animal abordado para el tratamiento (por ejemplo, un anticuerpo humanizado para el tratamiento de sujetos humanos), minimizando de este modo cualquier respuesta inmune al reactivo.

- 25 Pueden proporcionarse anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y citoquinas por infusión continua, o por dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, 1-7 veces por semanas, una semana, dos semanas, mensualmente, bimensualmente, etc. Las dosis pueden proporcionarse por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral, intraespinal, o por inhalación. Un protocolo de dosis preferido es uno que implica la dosis o frecuencia de dosis máxima que evita efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total es generalmente de
- 30 al menos 0,05 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg de peso corporal o más. Véase, por ejemplo, Yang y col. (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold y col. (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu y col. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67: 451-456; Portielji y col. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144. La dosis deseada de un agente terapéutico de molécula pequeña, por ejemplo, un mimético peptídico, producto natural, o agente químico orgánico, es aproximadamente
- 35 la misma que para un anticuerpo o polipéptido, en una base de moles/kg.

Como se usa en este documento, "inhibir" o "tratar" o "tratamiento" incluye un aplazamiento del desarrollo de los síntomas asociados con la enfermedad autoinmune o inmunopatología inducida por el patógeno y/o una reducción en la gravedad de dichos síntomas que se desarrollarán o se espera que se desarrollen. Las expresiones adicionalmente incluyen mejorar los síntomas inmunopatológicos existentes no controlados o indeseados relacionados con

40 autoinmunidad o inducidos por el patógeno, prevenir síntomas adicionales, y mejorar o prevenir las causas subyacentes de dichos síntomas. Por tanto, los términos indican que se ha conferido un resultado beneficioso a un sujeto vertebrado con una enfermedad o síntoma inmunopatológico inducido por autoinmunidad o un patógeno, o con el potencial de desarrollar dicha enfermedad o síntoma.

Como se usa en este documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto de unión específico para IL-23p19, por ejemplo un anticuerpo, que cuando se administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a una célula, tejido, o sujeto es eficaz para prevenir o mejorar la enfermedad autoinmune o la enfermedad o afección inmunopatológica inducida por un patógeno o la progresión de la enfermedad. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere adicionalmente a la cantidad del compuesto suficiente para provocar la mejora de los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o

50 mejora de la afección médica relevante, o un aumento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de dichas afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual administrado solo, una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que provocan el efecto terapéutico, se administran en combinación, en serie o de forma simultánea. Una cantidad eficaz de agente terapéutico disminuirá los síntomas típicamente en al menos un 10%; habitualmente en al menos un 20%; preferiblemente en al menos aproximadamente un 30%; más preferiblemente en al menos un 40%, y mucho más preferiblemente en al menos un 50%.

Los procedimientos para la co-administración o tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citoquina, anticuerpo, esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico, o radiación, son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Hardman y col. (eds.) (2001) *Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A*

60

Practical Approach, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams y Wilkins, Phila., PA. La composición farmacéutica de la invención también puede contener otros agentes inmunosupresores o inmunomoduladores. Puede emplearse cualquier agente inmunosupresor adecuado incluyendo, aunque sin limitación, agentes anti-inflamatorios, corticosteroides, ciclosporina, tacrolimus (es decir, FK-506), sirolimus, interferones, receptores solubles de citoquinas (por ejemplo, sTNRF y sIL-1R), agentes que neutralizan la actividad citoquina (por ejemplo, inflixmab, etanercept), micofenolato mofetilo, 15-desoxiespergualina, talidomida, glatiramer, azatioprina, leflunomida, ciclofosfamida, metotrexato, y similares. La composición farmacéutica también puede emplearse con otras modalidades terapéuticas tales como fototerapia y radiación.

Los sujetos veterinarios, experimentales, o de investigación típicos incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayas, caballos, y seres humanos.

VII. Producción de anticuerpos

En una realización, para la producción recombinante de los anticuerpos de la presente invención, se aíslan los ácidos nucleicos que codifican las dos cadenas y se insertan en uno o más vectores replicables para su clonación adicional (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector generalmente incluyen, aunque sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. En una realización, las cadenas tanto ligera como pesada del anticuerpo anti-IL-23p19 humanizado de la presente invención se expresan a partir del mismo vector, por ejemplo, un plásmido o un vector adenoviral.

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. En una realización, los anticuerpos se expresan en células de mamífero o insecto en cultivo, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células renales embrionarias humanas (HEK) 293, células NSO de mieloma de ratón, células renales de cría de hámster (BHK), células de ovario de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). En una realización, los anticuerpos secretados de células CHO se recuperan y se purifican por procedimientos cromatográficos convencionales, tales como cromatografía con proteína A, de intercambio catiónico, de intercambio aniónico, de interacción hidrófoba, y con hidroxipatita. Los anticuerpos resultantes se concentran y se almacenan en acetato sódico 20 mM, pH 5,5.

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención se producen en levaduras de acuerdo con los procedimientos descritos en el documento WO2005/040395. En resumen, los vectores que codifican las cadenas ligera o pesada individuales de un anticuerpo de interés se introducen en diferentes células haploides de levadura, por ejemplo, diferentes tipos de apareamiento de la levadura *Pichia pastoris*, siendo dichas células haploides de levadura opcionalmente auxótrofos complementarios. Las células haploides de levadura transformadas después pueden aparearse o fusionarse para dar una célula diploide de levadura capaz de producir la cadena tanto pesada como ligera. La cepa diploide entonces es capaz de secretar el anticuerpo completamente ensamblado y biológicamente activo. Los niveles de expresión relativa de las dos cadenas pueden optimizarse, por ejemplo, usando vectores con diferente número de copias, usando promotores de transcripción de diferente fuerza, o induciendo la expresión a partir de promotores inducibles que dirigen la transcripción de los genes que codifica una o ambas cadenas.

En una realización, se introducen las respectivas cadenas pesada y ligera de una pluralidad de diferentes anticuerpos anti-IL-23p19 (los anticuerpos "originales") en células haploides de levadura para crear una biblioteca de cepas haploides de levadura de un tipo de apareamiento que expresa una pluralidad de cadenas ligeras, y una biblioteca de cepas haploides de levadura de un tipo diferente de apareamiento que expresa una pluralidad de cadenas pesadas. Estas bibliotecas de cepas haploides pueden aparearse (o fusionarse como esferoplastos) para producir una serie de células diploides de levadura que expresan una biblioteca combinatoria de anticuerpos compuestos por las diversas posibles permutaciones de cadenas ligera y pesada. La biblioteca combinatoria de anticuerpos entonces puede explorarse para determinar si alguno de los anticuerpos tiene propiedades que sean superiores (por ejemplo, mayor afinidad por EL-23) a las de los anticuerpos originales. Véase, por ejemplo, el documento WO2005/040395.

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos de dominio humano en los que partes de un dominio variable del anticuerpo están unidas en un polipéptido de peso molecular aproximadamente de 13 kDa. Véase, por ejemplo, publicación de patente de Estados Unidos N° 2004/0110941. Para dicho dominio sencillo, agentes de bajo peso molecular proporcionan numerosas ventajas en términos de facilidad de síntesis, estabilidad, y vía de administración.

VIII. Usos

La presente descripción proporciona procedimientos para usar anticuerpos anti-IL-23 diseñados por ingeniería genérica y fragmentos de los mismos para el tratamiento y diagnóstico de trastornos y afecciones inflamatorias, por ejemplo, del sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico, y del tracto gastrointestinal, así como trastornos

autoinmunes y proliferativos.

Se proporcionan procedimientos para el tratamiento de, por ejemplo, la esclerosis múltiple (MS), incluyendo MS remitente-recurrente y MS progresiva primaria, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (a.k.a. ALS; enfermedad de Lou Gehrig), lesión cerebral isquémica, enfermedades por priones, y demencia asociada con el VIH.

5 También se proporcionan procedimientos para tratar el dolor neuropático, las neuropatías post-traumáticas, el síndrome de Guillain-Barre (GBS), la polineuropatía periférica, y la regeneración nerviosa.

Se proporcionan procedimientos para tratar o mejorar una o más de las siguientes características, síntomas, aspectos, manifestaciones, o signos de esclerosis múltiple, u otro trastorno o afección inflamatorio del sistema nervioso: lesiones cerebrales, lesiones de la mielina, desmielinización, placas desmielinizadas, alteración visual, pérdida de equilibrio o coordinación, espasticidad, alteraciones sensoriales, incontinencia, dolor, debilidad, fatiga, parálisis, alteración cognitiva, bradifrenia, diplopía, neuritis óptica, parestesia, ataxia del caminar, fatiga, síntoma de Uhtoff, neuralgia, afasia, apraxia, convulsiones, pérdida de campos visuales, demencia, fenómenos extrapiramidales, depresión, sensación de bienestar, u otros síntomas emocionales, mielopatía progresiva crónica, y un síntoma detectado por imágenes de resonancia magnética (MRI), incluyendo lesiones potenciadas por gadolinio, registros de potencial provocado, o examen de líquido cefalorraquídeo. Véase, por ejemplo, Kenealy y col. (2003) J. Neuroimmunol. 143:7-12; Noseworthy y col. (2000) New Engl. J. Med 343:938-952; Miller y col. (2003) New Engl. J. Med 348:15-23; Chang y col. (2002) New Engl. J. Med. 346:165-173; Bruck y Stadelmann (2003) Neurol. Sci. 24 Supl. 5:S265-S267.

10 Además, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar y diagnosticar enfermedades inflamatorias del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, y síndrome del intestino irritable.

20 Se proporcionan procedimientos para tratar o mejorar uno o más de los siguientes síntomas, aspectos, manifestaciones, o signos de un trastorno inflamatorio del intestino: mala absorción de alimentos, motilidad alterada del intestino, infección, fiebre, dolor abdominal, diarrea, hemorragia rectal, pérdida de peso, signos de malnutrición, enfermedad perianal, masa abdominal, y fallo en el crecimiento, así como complicaciones intestinales tales como estenosis, fístulas, megacolon tóxico, perforación, y cáncer, e incluyendo hallazgos endoscópicos, tales como, friabilidad, úlceras aftosas y lineales, aparición de cálculos, pseudopólipos, e implicación rectal y, además, anticuerpos anti-levadura. Véase, por ejemplo, Podolsky, *supra*; Hanauer, *supra*; Horwitz y Fisher, *supra*.

25 También se contempla el tratamiento de trastornos inflamatorios tales como psoriasis, dermatitis atópica, artritis, incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, y artritis psoriásica, trastornos autoinmunes, tales como lupus sistémico eritematoso y diabetes tipo I, y trastornos proliferativos tales como cáncer. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente PCT WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; y WO 01/18051.

30 El anticuerpo contra IL-23p19 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención también puede usarse en combinación con uno o más antagonistas de otras citoquinas (por ejemplo, anticuerpos), incluyendo, aunque sin limitación, IL-17A, IL-17F, IL-1 β , IL-6 y TGF- β . Véase, por ejemplo, Veldhoen (2006) Immunity 24:179-189; Dong (2006) Nat. Rev. Immunol. 6(4):329-333. En diversas realizaciones, se administra un anticuerpo contra IL-23p19 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención antes, de forma concurrente con, o después de la administración del otro antagonista o antagonistas, tal como un anticuerpo anti-IL-17A. En una realización, se usa un compuesto de unión a IL-17A en el tratamiento de la fase temprana aguda de una respuesta inmune adversa (por ejemplo, MS, enfermedad de Crohn) solo o en combinación con un anticuerpo antagonista de IL-23 de la presente invención. En el último caso, el compuesto de unión a IL-17A puede disminuirse gradualmente y el tratamiento con el antagonista de IL-23 solo se continúa para mantener la supresión de la respuesta adversa. Como alternativa, pueden administrarse antagonistas de IL-1 β , IL-6 y/o TGF- β de forma concurrente con, antes o después de un anticuerpo contra IL-23p19 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. Véase Cua y Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559; Tato y O'Shea (2006) Nature 441: 166-168; Iwakura e Ishigame (2006) J. Clin. Invest. 116:1218-1222.

35 El amplio alcance de esta invención se entiende mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar las invenciones a las realizaciones específicas. Las realizaciones específicas descritas en este documento se ofrecen a modo de ejemplo solamente, y la invención debe limitarse por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el completo alcance de los equivalentes a los que dan derecho dichas reivindicaciones.

Ejemplos

50 Ejemplo 1

Procedimientos generales

Se describen procedimientos convencionales en biología molecular. Maniatis y col. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning, 3^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA. Los procedimientos convencionales también aparecen en Ausbel y col. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1-4, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, NY, que describe la clonación en células bacterianas y la mutagénesis del ADN (Vol. 1), la clonación en células de mamífero y levaduras (Vol. 2), los glucoconjugados y la expresión de proteínas (Vol. 3), y la bioinformática (Vol. 4).

- Se describen procedimientos para la purificación de proteínas incluyendo inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación, y cristalización. Coligan y col. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York. Se describen el análisis químico, la modificación química, la modificación post-traduccional, la producción de proteínas de fusión, la glucosilación de proteínas. Véase, por ejemplo, Coligan y col. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Ausubel y col. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pág. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pág. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pág. 384-391. Se describen la producción, purificación, y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Coligan y col. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, *supra*. Están disponibles técnicas convencionales para caracterizar interacciones ligando/receptor. Véase, por ejemplo, Coligan y col. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York.
- Están disponibles procedimientos para citometría de flujo, incluyendo sistemas de detección por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS®). Véase, por ejemplo, Owens y col. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2ª ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ. Están disponibles reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluyendo cebadores y sondas de ácido nucleico, polipéptidos, y anticuerpos para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico. *Molecular Probes* (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO.
- Se describen procedimientos convencionales de histología del sistema inmune. Véase, por ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, y col. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, y Wilkins, Phila, PA; Louis, y col. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Nueva York, NY.

- Están disponibles paquetes de software y bases de datos para determinar, por ejemplo, fragmentos antigénicos, secuencias líder, plegamiento de proteínas, dominios funcionales, sitios de glucosilación, y alineaciones de secuencia. Véase, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne y col. (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne y col. (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren y col. (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690.

Ejemplo 2

Generación y humanización de anticuerpos anti-IL-23p19 humana

- Se generaron anticuerpos anti-IL-23p19 humana inmunizando ratones IL-23p19 knockout con IL-23 quimérica (p19 humana:p40 de ratón). Los anticuerpos monoclonales se prepararon por procedimientos convencionales.
- La humanización de los dominios variables del anticuerpo murino 13B8 (IgG1 de ratón/kappa) se realizó esencialmente como se describe en las publicaciones de solicitud de patente PCT WO 2005/047324 y WO 2005/047326.
- En resumen, la secuencia de aminoácidos del dominio VH no humano del anticuerpo 13B8 se comparó con un grupo de cinco secuencias de aminoácidos de la línea germinal de VH humano; un representante de los subgrupos IGHV1 e IGHV4 y tres representantes del subgrupo IGHV3. Los subgrupos VH se enumeran en M.-P. Lefranc (2001) "Nomenclature of the Human Immunoglobulin Heavy (IGH) Genes", *Experimental and Clinical Immunogenetics* 18:100-116. El anticuerpo 13B8 obtuvo la mayor valoración contra DP-14 de la línea germinal de cadena pesada humana en el subgrupo VH1.
- La secuencia VL del anticuerpo 13B8 es de la subclase kappa de VL. La secuencia de aminoácidos del dominio VL no humano se comparó con un grupo de cuatro secuencias de aminoácidos de la línea germinal de VL kappa humano. El grupo de cuatro está compuesto por un representante de cada uno de los cuatro subgrupos establecidos de VL humano enumerados en V. Barbie y M.-P. Lefranc (1998) "The Human Immunoglobulin Kappa Variable (IGKV) Genes and Joining (IGKJ) Segments", *Experimental and Clinical Immunogenetics* 15:171-183 y M.-P. Lefranc (2001) "Nomenclature of the Human Immunoglobulin Kappa (IGK) Genes", *Experimental and Clinical Immunogenetics* 18:161-174. Los cuatro subgrupos también corresponden a los cuatro subgrupos enumerados en Kabat y col. (1991 – 5ª Ed.) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", U. S. Department of Health and Human Services, NIH Pub. 91-3242, pág. 103-130. El anticuerpo 13B8 obtuvo la mayor valoración contra Z-012 de la línea germinal de cadena ligera humana en el subgrupo VLkl.
- Se hicieron sustituciones adicionales de aminoácidos en CDRH2, como se ha analizado *supra* y se describen en las SEC ID Nº 24-26. Se clonaron los dominios variables de cadena pesada y ligera de 13B8 humanizado en vectores que codifican un dominio constante de cadena pesada γ 1 humano (IgG1) y un dominio constante de cadena ligera kappa, respectivamente. El anticuerpo 13B8 humanizado resultante (IgG1/kappa) se une a IL-23 humana y de mono

cynomolgus pero no a IL-12 humana, p40 humana o IL-23 de ratón.

Una vez se han determinado las secuencias de aminoácidos diana de las cadenas pesada variable y ligera, pueden generarse plásmidos que codifican el anticuerpo humanizado de longitud completa. Las secuencias plasmídicas pueden alterarse usando mutagénesis de Kunkel (Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 82:488-492) para cambiar la secuencia de ADN para las secuencias diana del anticuerpo humanizado. Simultáneamente, puede realizarse la optimización de codones para proporcionar una expresión potencialmente óptima.

Pueden construirse formas humanizadas de otros anticuerpos descritos en este documento sustituyendo las regiones flanqueantes humanas descritas para el anticuerpo 13B8 humanizado, o repitiendo el procedimiento para la selección de las mejores regiones flanqueantes humanas por los procedimientos descritos en este Ejemplo. La sustitución de las regiones flanqueantes humanas descritas en este documento como parte del anticuerpo humanizado 13B8 es más apropiada para anticuerpos con secuencias CDR similares a 13B8.

Ejemplo 3

Determinación de la constante de disociación en equilibrio (K_d) para el anticuerpo humanizado anti-IL-23 humana usando tecnología KinExA

La constante de disociación en equilibrio (K_d) para anticuerpos anti-IL-23 humana se determina usando el instrumento KinExA 3000. Savidyne Instruments Inc., Boise Idaho, EEUU. KinExA usa el principio del procedimiento de ensayo de exclusión cinética basado en la medición de la concentración de anticuerpo no en complejo en una mezcla de anticuerpo, antígeno y complejo anticuerpo-antígeno. La concentración anticuerpo libre se mide exponiendo la mezcla a un antígeno inmovilizado en fase sólida durante un periodo de tiempo muy corto. En la práctica, esto se consigue haciendo fluir la mezcla antígeno-anticuerpo en fase de solución pasando por las partículas recubiertas con antígeno atrapadas en una cubeta de flujo. Los datos generados por el instrumento se analizan usando un software adaptado. Las constantes de equilibrio se calculan usando una teoría matemática basada en las siguientes suposiciones:

1. La unión sigue la siguiente ecuación de unión reversible para el equilibrio:

$$K_{on} [Ab] [Ag] = K_{off} [AbAg]$$

2. El anticuerpo y el antígeno se unen 1:1 y el anticuerpo total es igual al complejo antígeno-anticuerpo más el anticuerpo libre.

3. La señal del instrumento está linealmente relacionada con la concentración de anticuerpo libre.

Se recubren partículas PMMA de 98 micrómetros (Savidyne, N° Cat. 440198) con IL-23 biotinilada de acuerdo con el "Protocolo para recubrir partículas PMMA con ligandos biotinilados que tienen brazos enlazadores cortos o inexistentes" de Savidyne. En este experimento, la IL-23 biotinilada comprende un complejo de IL-12p40 de ratón e IL-23p19 humana. Se usa EZ-link TFP PEO-biotina (Pierce, N° Cat. 21219) para preparar IL-23 biotinilada de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (boletín Pierce 0874). Todos los procedimientos experimentales se hacen de acuerdo con el manual KinExA 3000.

La unión de anticuerpos anti-IL-23p19 se evalúa en un ensayo de unión competitiva, en el que los anticuerpos se pre-incuban con IL-23 humana no ligada (nativa) que comprende dos cadenas unidas por enlace disulfuro, p19 humana (SEC ID N° 47) y p40 humana (número de acceso a GenBank P29460), a una serie de concentraciones. Las muestras resultantes, que comprenden una mezcla de anticuerpos no unidos y anticuerpos unidos a IL-23, después se hacen fluir sobre las partículas PMMA de rhIL-23 ("elastiquina") descritas en el párrafo precedente. La cantidad de anticuerpo capturado por las partículas PMMA entonces se detecta usando un anticuerpo secundario marcado den forma fluorescente.

La Tabla 3 muestra los resultados del análisis KinExA, incluyendo determinaciones duplicadas para cada anticuerpo.

Tabla 3

Valores de K_d determinados por KinExA	
Anticuerpo	K_d (pM)
m13B8	15, 52
hum13B8-a	64±40, 110, 365, 447
hum13B8-b	47,470,520
hum13B8-c	47,52,470

Ejemplo 4

Determinación de la constante de disociación en equilibrio (K_d) para anticuerpos humanizados anti-IL-23p19 humana usando tecnología BIAcore

5 Las determinaciones BIAcore se realizan esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2007/0048315 transferida legalmente. En resumen, se inmovilizan los ligandos (mAb anti-IL-23) en un chip detector BIAcore CM5 usando un procedimiento convencional de acoplamiento con amina. La IL-23 se diluye en PBS para producir diversas concentraciones. Las constantes cinéticas para las diversas interacciones se determinan usando el software BIAevaluation 3.1. La K_d se determina usando las constantes de velocidad de disociación y asociación calculadas.

10 La Tabla 4 proporciona los valores de K_d determinados por BIAcore, incluyendo determinaciones duplicadas.

Tabla 4
Determinación de K_d por BIAcore

Anticuerpo	K_d (pM)
m13B8	173, 228
hum13B8-a	72-104, 68-100, 81-129
hum13B8-b	77-129, 69-116
hum13B8-c	92-153

Ejemplo 5

Bioensayos de proliferación para la evaluación de anticuerpos neutralizantes anti-IL-23

15 Se evaluó la capacidad de un anticuerpo monoclonal de neutralizar biológicamente IL-23 mediante la aplicación de bioensayos de proliferación a corto plazo que emplean células que expresan receptores recombinantes de IL-23. La línea celular transfectante IL-23R (Ba/F3-2.210-hIL-23R) expresa tanto hIL-23R como hIL-12R β 1, y es sensible tanto a IL-23 humana como a IL-23 de mono cynomolgus. Las células transfectantes Ba/F3-2.210 proliferan en respuesta a IL-23 humana y la respuesta puede inhibirse por un anticuerpo neutralizante anti-IL-23. Se titula un anticuerpo frente a una concentración de IL-23 elegida dentro de la región lineal de la curva de respuesta a dosis, casi plana y por encima de la CE50. La proliferación, o la ausencia de la misma, se mide por medios colorimétricos usando azul de Alamar, un colorante indicador de crecimiento basado en la detección de la actividad metabólica. La capacidad de un anticuerpo de neutralizar la IL-23 se evalúa mediante su valor de CI50, o la concentración del anticuerpo que induce la inhibición mitad de la máxima de la proliferación de IL-23.

20
25 Los transfectantes Ba/F3 se mantienen en medio RPMI-1640, suero de ternera fetal al 10%, 2-mercaptoetanol 50 μ M, L-Glutamina 2 mM, 50 μ g/ml de penicilina-estreptomina, y 10 ng/ml de IL-3 de ratón. Los bioensayos de proliferación de Ba/F3 se realizan en medio RPMI-1640, suero de ternera fetal al 10%, 2-mercaptoetanol 50 μ M, L-Glutamina 2 mM, y 50 μ g/ml de penicilina-estreptomina.

Procedimiento

30 Los ensayos se realizan en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon 3072 o similar) en 150 μ l por pocillo. Los anticuerpos anti-IL-23 se pre-incuban con IL-23 durante 30-60 min., seguido de la adición de células e incubación durante 40-48 horas. Se añade azul de Alamar (Biosource N° Cat. DAL1100) y se deja revelar durante 5-12 horas. Después se lee la absorbancia a 570 nm y 600 nm (lector de microplacas VERSAmax, Molecular Probes, Eugene, Oregón, EEUU), y se obtiene una $DO_{570-600}$.

35 Las células se usan en un estado de crecimiento sano, generalmente a densidades de $3-8 \times 10^5$ /ml. Las células se cuentan, se sedimentan, se lavan dos veces en medio de bioensayo, y se suspenden a la densidad apropiada para la siempre en placa. Se realiza una respuesta a dosis de IL-23 usando diluciones 1:3 en serie (25:50 μ l en medio de bioensayo) de IL-23. Se selecciona una concentración de IL-23 de 3 ng/ml (50 pM) para su uso en los ensayos de anticuerpos. También se realiza una respuesta a dosis de anticuerpo neutralizante usando diluciones 1:3 en serie (25:50 μ l en medio de bioensayo).

40 Los valores de CI50 se determinan usando el software GraphPad Prism® 3.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, California, EEUU), en que se representa la absorbancia frente a la concentración de citoquina o anticuerpo y los valores de CI50 se determinan usando regresión no lineal (ajuste a curva) de la respuesta a dosis sigmoidal.

La Tabla 5 muestra los valores de CI50 para bloquear la proliferación de las células Ba/F3 mediante anticuerpos anti-IL-23p19. Se incluyen los valores para múltiples determinaciones para algunos anticuerpos.

Tabla 5

Valores de CI50 para el bloqueo de la proliferación de células Ba/F3 por anticuerpos anti-IL-23	
Anticuerpo	CI50 (pM)
m13B8	700
hum13B8-a	1100, 1100
hum13B8-b	1200, 1100
hum13B8-c	1100, 2200

5 Ejemplo 6

Ensayo de esplenocitos de ratón para IL-23 basado en la producción de IL-17

La actividad biológica de los anticuerpos anti-IL-23p19 de la presente invención se evalúa usando el ensayo de esplenocitos esencialmente como se describe en Aggarwal y col. (2003) J. Biol. Chem. 278:1910 y Stumhofer y col. (2006) Nature Immunol. 7:937. El ensayo de esplenocitos de ratón mide la actividad de IL-23 en una muestra como un nivel de producción de IL-17 por esplenocitos murinos. La actividad inhibidora de los anticuerpos anti-IL-23p19 entonces se evalúa determinando la concentración de anticuerpo necesaria para reducir la actividad IL-23 en una muestra dada en un 50% (la CI50). La CI50 medida por este ensayo es mayor o igual a la constante de unión de disociación en equilibrio (K_d), es decir, la K_d puede ser igual o inferior a la CI50. Como siempre, valores de CI50 y K_d inferiores reflejan mayores actividades y afinidades.

En resumen, se obtienen bazo de ratones C57BL/6J hembra de 8-12 semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, EEUU). Los bazo se trituran, se sedimentan dos veces, y se filtran a través de un filtro celular (nylon de 70 μ m). Las células recuperadas se cultivan en placas de 96 pocillos (4×10^5 células/pocillo) en presencia de IL-23 humana (10 ng/ml, ~170 pM) y anticuerpos de ratón anti-CD3e (1 μ g/ml) (BD Pharmingen, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EEUU), con o sin el anticuerpo anti-IL-23p19 a ensayar. Los anticuerpos anti-IL-23p19 se añaden a 10 μ g/ml y a una serie de diluciones de factor 3. Las células se cultivan durante 72 horas, se sedimentan, y se ensaya el sobrenadante para los niveles de IL-17 por ELISA tipo sándwich.

El ELISA de IL-17 se realiza del siguiente modo. Se recubren placas con un anticuerpo de captura anti-IL-17 (100 ng/pocillo) durante una noche a 4°C, se lavan y se bloquean. Se añaden las muestras y los patrones y se incuban durante dos horas a temperatura ambiente con agitación. Se lavan las placas, y se añade un anticuerpo de detección biotinilado anti-IL-17 (100 ng/pocillo) y se incuba durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Los anticuerpos de captura y detección son anticuerpos diferentes que se unen ambos a IL-17 de ratón pero no realizan bloqueo cruzado. Se lavan las placas, y se detecta el anticuerpo de detección unido usando estreptavidina-HRP (peroxidada de rábano rústicano) y TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). La placa después se lee a 450-650 nm y se calcula la concentración de IL-17 en las muestras por comparación con los patrones.

Los valores de CI50 del ensayo de esplenocitos se proporcionan en la Tabla 6, incluyendo algunas determinaciones duplicadas.

Tabla 6

CI50 del ensayo de esplenocitos	
Clon de anticuerpo	CI50 (pM)
m13B8	28, 54, 64
hum13B8-a	71-108
hum13B8-b	110, 221
hum13B8-c	515

Ejemplo 7

Caracterización de una preparación de anticuerpo 13B8-b anti-IL-23p19

5 El anticuerpo humanizado 13B8-b anti-IL-23p19 se prepara a partir de células de mamífero usando un vector que alberga secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de 13B8-b, proporcionadas en las SEC ID N° 49 y 50, respectivamente.

Hum 13B8-b tiene una K_d de 297 pM para IL-23 humana cuando se ensaya por análisis BIAcore, esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 (*supra*).

10 La actividad biológica de hum13B8-b se evalúa usando el ensayo de proliferación de Ba/F3, esencialmente como se describe en el Ejemplo 5 (*supra*), excepto que se usa 340 pM de IL-23 para estimular la proliferación, en lugar de 50 pM. La actividad inhibidora de los anticuerpos anti-IL-23p19 (la CI50) se evalúa determinando la concentración de anticuerpo necesaria para reducir la actividad IL-23 en una muestra dada en un 50%. Como siempre, valores inferiores de CI50 reflejan actividades más elevadas. Hum13B8-b muestra una CI50 de 187 pM en el ensayo de proliferación de Ba/F3.

15 La actividad biológica de hum13B8-b también se evalúa usando un ensayo de esplenocitos humanos, esencialmente como se describe en el Ejemplo 6 (*supra*) con la excepción de que los esplenocitos se obtienen de bazo humano en lugar de bazo de ratón, no se usa anticuerpo anti-CD3e, y la lectura es de IFN- γ en lugar de IL-17. El ensayo mide la actividad de IL-23 en una muestra determinando el nivel de producción de IFN- γ por esplenocitos primarios humanos. Los esplenocitos humanos se exponen a IL-23 humana (170 pM) en presencia de diversas concentraciones de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19, o en ausencia del anticuerpo. El IFN- γ se detecta por ELISA tipo sándwich.
20 Hum13B8-b muestra una CI50 de 59-144 pM en el ensayo de esplenocitos humanos.

La actividad biológica de hum13B8-b se evalúa adicionalmente usando un ensayo de fosforilación de KIT225 con STAT-3, esencialmente como se describe en Parham y col. (2002) J. Immunol. 168:5699. Se estimulan células KIT225 humanas, una línea leucémica de células T, con IL-23 humana 138 pM en presencia de diversas concentraciones de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19, o en ausencia del anticuerpo. La actividad IL-23 se mide detectando el nivel de fosforilación de STAT3. Hum13B8-b muestra una CI50 de 130 pM en el ensayo de KIT225.
25

Ejemplo 8

Epítipo para el anticuerpo humanizado 13B8-b anti-IL-23p19

30 El epítipo para la unión del anticuerpo humanizado 13B8-b a IL-23p19 humana (SEC ID N° 47) se determinó por cristalografía de rayos X. Se determinaron las coordenadas para un complejo de un fragmento Fab del anticuerpo humanizado 13B8-b anti-IL-23p19 e IL-23 humana no ligada, que comprende las subunidades p19 y p40. La subunidad p40 en la IL-23 usada para determinar la estructura cristalina tiene una sustitución N222Q en la que la Asn222 está remplazada por Gln. La secuencia de IL-23p19 humana se encuentra en la SEC ID N° 47 y la secuencia de la forma madura de IL-12/IL-23 p40 humana se encuentra en los restos 23-328 del número de acceso a GenBank P29460. El anticuerpo humanizado 13B8-b anti-IL-23p19 comprende la cadena pesada humanizada de 13B8-b (SEC ID N° 7), la cadena ligera humanizada de 13B8-b (SEC ID N° 14). Las condiciones de cristalización son polietilenglicol 4000 al 15%, acetato sódico 60 mM, TRIS-HCl 100 mM (pH 8). Los cristales también pueden obtenerse con otros tampones a o aproximadamente a pH 8.
35

40 Los restos aminoacídicos de IL-23 dentro de una distancia de 4,0 Å de restos en el anticuerpo 13B8-b incluyen K20, T23, W26, S27, P30, E82, S95, L96, L97, P98, D99, P101, G103, Q104, H106, A107 y L110. Los restos adicionales L24, L85, T91, S100 y V102 estaban dentro de una distancia de 5,0 Å. Un resto aminoacídico en IL-23p19 se considera dentro de una distancia dada del anticuerpo (por ejemplo, 4,0 Å o 5,0 Å) si las coordenadas de cualquier átomo de resto están dentro de la distancia dada de las coordenadas de cualquier átomo del anticuerpo.

45 La mayoría de estos restos contactados están dentro de dos grupos principales a lo largo de la estructura primaria de IL-23p19, comprendiendo el primer grupo los restos 20-30 (en el que 6 de los 11 restos están dentro de una distancia de 5,0 Å del anticuerpo y 5 de los 11 están dentro de una distancia de 4,0 Å) y comprendiendo el segundo grupo los restos 82-110 (en el que 16 de los 29 restos están dentro de una distancia de 5,0 Å del anticuerpo y 12 de los 29 están dentro de una distancia de 4,0 Å). Estos grupos definen epítopes que comprenden tramos de 11 o más restos aminoacídicos contiguos de IL-23p19 en los que el 30%, 40%, 45%, 50% o 54% o más de los restos están dentro de una distancia de 4,0 Å o 5,0 Å del anticuerpo.

50 Se esperaría que anticuerpos que se unen a cualquiera de estos grupos o a ambos, bloquearan la unión del anticuerpo 13B8-b, y se esperaría que mostraran actividades biológicas similares.

La Tabla 7 proporciona una breve descripción de las secuencias de la lista de secuencias.

Tabla 7

Identificadores de secuencia	
SEC ID Nº	Descripción
1	m1A11 V _H
2	m11C1 V _H
3	m5F5 V _H
4	m21D1 V _H
5	m13B8 V _H
6	hum13B8 HC-a
7	hum13B8 HC-b
8	hum13B8 HC-c
9	m1A11 V _L
10	m11C1 V _L
11	m5F5 V _L
12	m21D1 V _L
13	m13B8 V _L
14	hum13B8 LC
15	m1A11 CDRH1
16	m11C1 CDRH1
17	m5F5 CDRH1
18	m21D1 CDRH1
19	m13B8 CDRH1
20	m1A11 CDRH2
21	m11C1 CDRH2
22	m5F5 CDRH2
23	m21D1 CDRH2
24	m13B8 CDRH2-a
25	h13B8 CDRH2-b
26	h13B8 CDRH2-c
27	m1A11 CDRH3
28	m11C1 CDRH3
29	m5F5 CDRH3
30	m21D1 CDRH3
31	m13B8 CDRH3
32	m1A11 CDRL1

(continuación)

Identificadores de secuencia	
SEC ID Nº	Descripción
33	m11C1 CDRL1
34	m5F5 CDRL1
35	m21D1 CDRL1
36	m13B8 CDRL1
37	m1A11 CDRL2
38	m11C1 CDRL2
39	m5F5 CDRL2
40	m21D1 CDRL2
41	m13B8 CDRL2
42	m1A11 CDRL3
43	m11C1 CDRL3
44	m5F5 CDRL3
45	m21D1 CDRL3
46	m13B8 CDRL3
47	IL-23p19 humana
48	IL-23p19 de ratón
49	ADN de hum13B8-b HC
50	ADN de hum13B8 LC

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Schering Corporation

5 <120> Anticuerpos anti-IL-23p19 diseñados por ingeniería genérica

<130> P32094EP-PCT

<140> PCT/US2008/002333

<141> 20-02-2008

<150> 60/891.409

10 <151> 23-02-2007

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 117

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

ES 2 388 837 T3

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

<210> 2
 <211> 116
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

His Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Trp Met Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

ES 2 388 837 T3

35 40 45

Gly Gln Ile Phe Pro Val Arg Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Ile Phe
50 55 60

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

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ala
115

<210> 3
<211> 124
<212> PRT
5 <213> Mus musculus

<400> 3

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Asp Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp
100 105 110

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

<210> 4

ES 2 388 837 T3

<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

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

10 <210> 5
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

ES 2 388 837 T3

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

<210> 6

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Regiones flanqueantes humanas, CDR de roedor

<220>

<221> DOMINIO

10 <222> (1)..(116)

<223> Dominio variable

<400> 6

ES 2 388 837 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Met Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

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

5 <210> 7
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Regiones flanqueantes humanas, CDR de roedor

10 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1)..(116)
 <223> Dominio variable

<400> 7

ES 2 388 837 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
20 25 30

ES 2 388 837 T3

Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser

ES 2 388 837 T3

	325				330									335
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			340					345					350	Pro
														Pro
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		355					360					365		Val
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
	370					375					380			Gly
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
385					390					395				Asp
														400
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405					410					415
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			420					425					430	His
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
		435					440					445		

<210> 8
 <211> 446
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Regiones flanqueantes humanas, CDR de roedor

 <220>
 10 <221> DOMINIO
 <222> (1)..(116)
 <223> Dominio variable

 <400> 8

ES 2 388 837 T3

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

ES 2 388 837 T3

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160 165
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

ES 2 388 837 T3

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

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

5 <210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

10 <210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

ES 2 388 837 T3

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

5 <210> 11
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 11

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

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

Ser Asn Asp Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Ser Phe Thr
35 40 45

Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg
50 55 60

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

Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser
85 90 95

Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

10 <210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

ES 2 388 837 T3

<400> 12

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

- 5 <210> 13
- <211> 108
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 13

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

10

ES 2 388 837 T3

<210> 14
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Regiones flanqueantes humanas, CDR de roedor

<220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(108)

10 <223> Dominio variable

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

ES 2 388 837 T3

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 15
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 15

Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Tyr Ile Gln
 1 5 10

10 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16

Gly Tyr Ile Phe Ser Ala Tyr Trp Met Thr
 1 5 10

15

<210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 17

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10

<210> 18
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 18

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Phe Phe Ile His
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 19

Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr Trp Met Thr
 1 5 10

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 20

Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Ala Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25 <400> 21

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

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 22

Gly

<210> 22

35 <400> 22

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

Gly

ES 2 388 837 T3

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 23

Trp Ile Phe Pro Gly Asn His Asp Val Glu Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 24

10 <400> 24

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Met Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDR de roedor con una sustitución de aminoácido
 <400> 25

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> CDR de roedor con cuatro sustituciones de aminoácidos

<400> 26

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Leu Gln
 1 5 10 15

Gly

30 <210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27

ES 2 388 837 T3

Gln Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr

1

5

5 <210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 28

Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5

10 <210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 29

Gly Gly Asn Tyr Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

15 <210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 30

Gly Gly Gly Asn Leu Pro Tyr
1 5

20 <210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
25 <400> 31

Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5

30 <210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 32

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

35 <210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 33

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

ES 2 388 837 T3

<210> 34
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

5 <400> 34

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Ile Thr Ser Asn Asp Ala Asn
1 5 10

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 35

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <400> 36

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <400> 37

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <400> 38

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

30 <400> 39

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro
1 5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <400> 40

<400> 40

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
5 <213> Mus musculus

<400> 41

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 42
<211> 9
10 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 43
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 43

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 44
<211> 9
20 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 44

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
1 5

<210> 45
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Mus musculus

30 <400> 45

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 46
<211> 9
35 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 46

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

ES 2 388 837 T3

<210> 47
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 47

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

<210> 48
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<400> 48

ES 2 388 837 T3

Val Pro Arg Ser Ser Ser Pro Asp Trp Ala Gln Cys Gln Gln Leu Ser
1 5 10 15

Arg Asn Leu Cys Met Leu Ala Trp Asn Ala His Ala Pro Ala Gly His
20 25 30

Met Asn Leu Leu Arg Glu Glu Glu Asp Glu Glu Thr Lys Asn Asn Val
35 40 45

Pro Arg Ile Gln Cys Glu Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Lys Asp
50 55 60

Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile Arg Gln Gly Leu Ala Phe Tyr
65 70 75 80

Lys His Leu Leu Asp Ser Asp Ile Phe Lys Gly Glu Pro Ala Leu Leu
85 90 95

Pro Asp Ser Pro Met Glu Gln Leu His Thr Ser Leu Leu Gly Leu Ser
100 105 110

Gln Leu Leu Gln Pro Glu Asp His Pro Arg Glu Thr Gln Gln Met Pro
115 120 125

Ser Leu Ser Ser Ser Gln Gln Trp Gln Arg Pro Leu Leu Arg Ser Lys
130 135 140

Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Leu Ala Ile Ala Ala Arg Val Phe
145 150 155 160

Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Thr Glu Pro Leu Val Pro Thr Ala
165 170 175

<210> 49

<211> 1398

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Regiones constante y flanqueantes humanas, CDR de roedor

<400> 49

ES 2 388 837 T3

atggctgtgc tggggctgct gttctgcctg gtgacattcc caagctgtgt gctgtcccag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg cgctgaggtg aagaagcctg ggcctccgt gaaggtctcc 120
 tgcaaggctt ctggctacat cttcatcacc tactggatga cctgggtgcg gcaggcccct 180
 ggccaggggc tggagtggat gggccagatc ttccctgcc a gggctctgc agactacaac 240
 gagaagtctg aaggcagagt caccatgacc acagacacat ccaccagcac agcctacatg 300
 gagctgagga gcctgagatc tgacgacacc gccgtgtatt actgtgccag aggcggtggc 360
 ggattcgctt actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct ccagcgctag caccaagggc 420
 ccatcggctt tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctgggggcac agcggcccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtg agcccaaadc ttgtgacaaa 720
 actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 780
 tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaata 1398

<210> 50
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Regiones constante y flanqueantes humanas, CDR de roedor

<400> 50

5

ES 2 388 837 T3

atggctccag tgcagctgct ggggctgctg gtgctgttcc tgccagccat gagatgtgat	60
atccagatga cccagtctcc atcctccctg tctgcctctg tgggcgacag agtgaccatc	120
acctgcagga ccagcgagaa catctacagc tacctggcct ggtatcagca gaagccaggg	180
aaggccccta agctgctgat ctataacgcc aagaccctgg ctgaaggggt gccatccagg	240
ttcagcggca gcggctctgg gacagacttc accctgacca tcagcagcct gcagcctgag	300
gacttcgcca cctactactg tcagcaccac tacggaattc cattcacctt cggccagggc	360
accaaggtgg agatcaagcg tacggtggct gcaccatctg tgttcatctt ccctccatct	420
gatgagcagc tgaagtctgg aactgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctatccc	480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggat aacgccctcc agagcggcaa ctcccaggag	540
agcgtgacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg	600
agcaaagcag actacgagaa acacaaggtg tacgcctgcg aggtgaccca tcagggcctg	660
agcagccccg tgacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa	702

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a IL-23 humana, que comprende:
 - a) un dominio variable de cadena ligera, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en el que:
 - 5 CDRL1 comprende la secuencia de la SEC ID N° 36;
CDRL2 comprende la secuencia de la SEC ID N° 41; y
CDRL3 comprende la secuencia de la SEC ID N° 46; y
 - b) un dominio variable de cadena pesada, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en el que:
 - 10 CDRH1 comprende la secuencia de la SEC ID N° 19;
CDRH2 comprende la secuencia de la SEC ID N° 25; y
CDRH3 comprende la secuencia de la SEC ID N° 31.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende los restos 1 - 108 de la SEC ID N° 14.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende los restos 1 - 116 de la SEC ID N° 7.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 que comprende:
 - un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo definido en la reivindicación 2; y
 - un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo definido en la reivindicación 3.
- 20 5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 4, que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que:
 - la cadena ligera comprende la secuencia de la SEC ID N° 14; y
 - la cadena pesada comprende la secuencia de la SEC ID N° 7.
- 25 6. Un ácido nucleico aislado que codifica el dominio variable de cadena ligera y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1.
7. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 6 unido de forma funcional a secuencias de control que se reconocen por una célula huésped cuando la célula huésped es transfectada con el vector.
8. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 7.
9. Un procedimiento para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:
 - 30 cultivar la célula huésped de la reivindicación 8 en medio de cultivo en condiciones en las que se expresa la secuencia de ácido nucleico, produciendo de este modo polipéptidos que comprenden los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; y
 - recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la célula huésped o el medio de cultivo.
- 35 10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada que comprende una región constante de cadena pesada humana γ 1 o una variante de la misma, en el que la variante de región constante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos modificados de forma conservativa.
- 40 11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una región constante de cadena pesada que comprende una región constante de cadena pesada humana γ 4 o una variante de la misma, en el que la variante de región constante comprende hasta 20 sustituciones de aminoácidos modificados de forma conservativa.
- 45 12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un fragmento de anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, y un diacuerpo.
13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 para su uso como un medicamento.
14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado entre el grupo constituido en artritis, psoriasis y enfermedad inflamatoria del intestino.

15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado entre el grupo compuesto en esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso y diabetes.
16. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 5 17. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, que comprende adicionalmente un agente inmunosupresor o anti-inflamatorio.
19. Una célula huésped que comprende:
- 10 a) un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1; y
b) un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1.
20. Un procedimiento para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:
- 15 cultivar la célula huésped de la reivindicación 19 en medio de cultivo en condiciones en las que se expresan las secuencias de ácido nucleico, produciendo de este modo polipéptidos que comprenden los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo; y
recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la célula huésped o el medio de cultivo.
- 20

```

                                ---CDRH1---
m1A11  EVQLQQSGPELVKTGASVNI SCKAS GYSFTAYYIQ WVKQSRGKSLEWIG
m11C1  HVQLQQSGPEVVRPGASVKLSCKAS GYIFSAYWMT WVKQRPQGQLEWIG
m5F5   QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKAS GYTFTSYGIS WVKQRTGQDLEWIG
m21D1  QVQLQQSGLELVKPGSSLKISCKAS GYSFTSFFIH WLKQRPQGQLEWIG
m13B8  HVQLQQSGPELVVRPGASVELSCKAS GYIFITYWMT WMKQRPQGQLEWIG
h13B8a QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKAS GYIFITYWMT WVRQAPGQGLEWMG
h13B8b QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKAS GYIFITYWMT WVRQAPGQGLEWMG
h13B8c QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKAS GYIFITYWMT WVRQAPGQGLEWMG

```

```

                -----CDRH2-----
m1A11  YISCYNGATRYNQKFKG KATFTVDTSSRTAYMQFSSLTSEDSAVYFCAR
m11C1  QIFPVRGSADYNEIFEG KATLTVDTSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCAR
m5F5   EIYPRSVNSYNERFKG KATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAR
m21D1  WIFPGNH DVEYNEKFKG KATLTADTSSSTADMHLSSLTSEDSAVYFCAR
m13B8  QIFPASGSADYNEMFEG KATLTVDTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR
h13B8a QIFPASGSADYNEMFEG RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
h13B8b QIFPASGSADYNEKFE G RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
h13B8c QIFPASGSADYAQKLQ G RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR

```

```

                -----CDRH3-----
m1A11  QGFYAMDY           WGQGTSVTVSS
m11C1  GGGGFAY           WGQGLVTVSA
m5F5   GGNYYGRNYGDYFDY WGQGTTLTVSS
m21D1  GGGNL-----PY   WGQGLVTVSA
m13B8  GGGGFAY           WGQGLVTVSA
h13B8a GGGGFAY           WGQGLVTVSS
h13B8b GGGGFAY           WGQGLVTVSS
h13B8c GGGGFAY           WGQGLVTVSS

```

Figura 1


```

-----CDRL1-----
m1A11  NVVMTQTPLTSLSVTIGQPASISC KSSQSLDSDGKT-YLN
m11C1  DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RASENIYS-----YLA
m5F5   SQAVVTQESALTTSPGETVTLTC RSSTGAVITSN---DAN
m21D1  DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RTSENIYS-----YLA
m13B8  DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RTSENIYS-----YLA
h13B8  DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RTSENIYS-----YLA

```

```

-CDRL2-
m1A11  WLLQRPGQSPKRLIY LVSKLDS GVPDRFTGSGSGT
m11C1  WYQEKWGKSPQLLVY NAKTLAE GVPSRFSGSGSGT
m5F5   WVQEKPDHSFTGLIG GTNNRAP GVPARFSGSLIGD
m21D1  WYQQKPGKAPKLLIY NAKTLAE GVPSRFSGSGSGT
m13B8  WYQQKQGKSPQLLVY NAKTLAE GVPSRFSGSGSGT
h13B8  WYQQKPGKAPKLLIY NAKTLAE GVPSRFSGSGSGT

```

```

--CDRL3--
m1A11  DFTLKISRVEAEDLGLYYC WQGFHPFT FSGGTKLEIKR
m11C1  QFSLKINSLQSEDFGSYYC QHHYGTPFT FSGGTKLEIKR
m5F5   KAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHWV FGGGTKLTVLG
m21D1  DFTLTISLQPEDFATYYC QHHYGIPFT FGQGTKVEIKR
m13B8  QFSLKINRLQPEDFGRYFC QHHYGIPFT FSGGTKLEIKR
h13B8  DFTLTISLQPEDFATYYC QHHYGIPFT FGQGTKVEIKR

```

Figura 2