

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 780**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06846464 .3**  
96 Fecha de presentación: **05.12.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1963368**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

54 Título: **Anticuerpos anti-IL-17**

30 Prioridad:  
**13.12.2005 US 749953 P**  
**19.05.2006 US 801948 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.10.2012**

73 Titular/es:  
**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)**  
**LILLY CORPORATE CENTER**  
**INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:  
**ALLAN, BARRETT;**  
**CHOW, CHI-KIN;**  
**HUANG, LIHUA;**  
**LIU, LING;**  
**LU, JIRONG;**  
**NG, KINGMAN;**  
**TETREAULT, JONATHAN WENDELL y**  
**WERNER, ANDREW GORDON**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 389 780 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-17

**Campo de la invención**

5 La presente invención se encuentra en el campo de la medicina, en particular en el campo de anticuerpos monoclonales contra IL-17 humana. La invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-IL-17 que se unen con afinidad elevada a un epítoto antigénico no lineal o conformacional de IL-17 que comprende los aminoácidos DGNVDYH (SEC ID N°: 276). Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos, inmunocjugados de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos y son útiles como medicamento para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, inflamatorios, de proliferación celular y de desarrollo.

**Antecedentes de la invención**

15 La familia de citocinas IL-17 incluye actualmente IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E y IL-17F. Todos los miembros de la familia IL-17 tienen cuatro restos de cisteína altamente conservados que están implicados en la formación de enlaces disulfuro intracatenarios y tienen dos o más restos de cisteína que pueden estar implicados en los enlaces disulfuro intracatenarios. Los miembros de la familia IL-17 no tienen similitud de secuencia con cualesquiera otras citocinas conocidas. No obstante, se encontró un homólogo viral de IL-17A en el marco de lectura abierto 13 de herpesvirus saimiri (Yao, Z. y col., *Immunity*, 3:811, 1995) y tiene el 72 % de identidad de restos de aminoácidos con la IL-17A humana. Se ha informado de múltiples funciones de los miembros de la familia IL-17 que implican en su mayor parte la regulación de la respuesta inmunitaria.

20 La interleucina 17 (IL-17, también denominada IL-17A) es una glucoproteína homodimérica de 20-30kD producida predominantemente por linfocitos T CD4+ activados y funciona como una citocina proinflamatoria. Cuando un miembro particular de la familia IL-17 se denomina sencillamente "IL-17," se entiende que el miembro de la familia al que se hace referencia es a la IL-17A. La IL-17 es segregada por linfocitos T activados en sitios de inflamación, no en la circulación sistémica. La IL-17 se une a un receptor transmembrana de tipo I denominado IL-17R, que es una proteína grande expresada de forma ubicua que no muestra similitud de secuencia significativa con otros receptores de citocinas conocidos. La IL-17 tiene múltiples propiedades biológicas que incluyen la regulación al alza de moléculas de adhesión e induce la producción de múltiples citocinas y quimiocinas inflamatorias de diversos tipos celulares, incluidos sinoviocitos, condrocitos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos y macrófagos. Además, la IL-17 induce el reclutamiento de neutrófilos en un sitio de inflamación mediante la inducción de la liberación de quimiocinas, estimula la producción de prostaglandinas y metaloproteinasas e inhibe la síntesis de proteoglicanos. Además, la IL-17 tiene un papel importante en la maduración de células progenitoras hematopoyéticas. Se ha demostrado que la IL-17 tiene papeles señalizadores en diferentes órganos y tejidos que incluyen pulmón, cartílago articular, hueso, cerebro, células hematopoyéticas, riñón, piel e intestino. Para una revisión de la bioactividad de IL-17 véase, por ejemplo, Kolls y Linden, *Immunity* 21:467-476, 2004, o Fossiez y col. *Int. Rev. Immunol.* 16:541, 1998.

40 Los niveles aumentados de IL-17 (es decir, IL-17A) se han asociado con diversas afecciones, enfermedades o trastornos que incluyen inflamación de vías aéreas, artritis reumatoide ("AR"), osteoartritis, erosión ósea, abscesos y adhesiones intraperitoneales, trastorno inflamatorio del intestino ("IBD"), rechazo de aloinjerto, psoriasis, determinados tipos de cáncer, angiogénesis, aterosclerosis y esclerosis múltiple ("EM") (para una revisión, véase Witkowski y col., *Cell. Mol. Life Sci.* 61:567-579, 2004). Tanto la IL-17 como el IL-17R están regulados al alza en el tejido sinovial de pacientes con AR. El bloqueo de la bioactividad de una IL-17 mediante su unión al anticuerpo específico de IL-17 o receptor soluble de IL-17 reduce la inflamación y la erosión ósea en varios modelos de artritis animal. (Véase, por ejemplo, Lubberts y col, *Arthritis & Rheumatism*, 50:650-659, 2004). Además, la IL-17 tiene efectos independientes de IL-1 $\beta$  sobre la degradación y la inflamación de la matriz de colágeno y lesiones articulares, mientras que la IL-17 tiene sinergia con TNF- $\alpha$  para amplificar la inflamación.

50 Por lo tanto, dada su distribución localizada en el sitio de inflamación, la IL-17 parece ser una diana novedosa para el tratamiento de AR y de otras enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias con un perfil de seguridad potencialmente superior al de fármacos dirigidos a la circulación sistémica de citocinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$ . Los productos biológicos aprobados por la FDA (Agencia de alimentos y fármacos de Estados Unidos) (anticuerpos ENBREL<sup>®</sup>, REMICADE<sup>®</sup> y HUMIRA<sup>®</sup>) que se unen y neutralizan TNF- $\alpha$  han demostrado una eficacia en la reducción de signos y síntomas de AR y en la ralentización de la progresión de la enfermedad en una serie de pacientes con AR. Sin embargo, no todos los pacientes con AR responden igual a la inhibición de la bioactividad de una TNF- $\alpha$  con estos productos biológicos. Adicionalmente, el ARNm de IL-17 aumenta en lesiones de esclerosis múltiple y en células mononucleares de la sangre y fluido cerebroespinal de pacientes con EM, en particular durante la exacerbación clínica. En consecuencia, existe la necesidad de composiciones que antagonicen o neutralicen la actividad de IL-17 con el fin de tratar trastornos, enfermedades o afecciones en los que la presencia de bioactividad de IL-17 causa, o contribuye a, un efecto patológico no deseado o en los que una disminución de la bioactividad de IL-17 contribuye a un efecto terapéutico deseado, incluidos trastornos inflamatorios, trastornos de proliferación celular y de desarrollo y trastornos autoinmunitarios tales como AR y EM e IBD.

Giavedoni, L D, Journal of Immunological Methods, Vol. 301, Nº 1-2, 89-101, junio de 2005, describe la detección simultánea de múltiples citocinas y quimiocinas a partir de primates no humanos usando tecnología luminex. En la tabla 1 se mencionan tres anticuerpos anti-IL-17.

5 Moseley, T a y col., Cytokine and Growth Factor Reviews, Vol. 14, Nº 2, 155-174, abril de 2003, describe la familia de interleucina-17 y receptores de IL-17.

El documento WO 2004/106377 describe un procedimiento de obtención de un anticuerpo con una función deseada. En la tabla 4 se describen anticuerpos anti-IL-17 C9 y D12.

10 Hofstetter y col., Cellular Immunology, Vol. 237, Nº 2 123-130, octubre de 2005, describe la eficacia terapéutica de la neutralización de IL-17 en encefalomiелitis autoinmunitaria experimental en murinos. Se encontró que la neutralización de IL-17 con un anticuerpo monoclonal mejora el curso de la enfermedad.

15 Existe la necesidad de un anticuerpo anti-IL-17 neutralizante que se una específicamente a IL-17 de origen humano, así como a IL-17 de un mamífero no humano, permitiendo de este modo que el anticuerpo se use en estudios preclínicos y clínicos *in vivo*. Además, existe la necesidad de un anticuerpo específico de IL-17 que se una a IL-17 con una afinidad alta y/o tenga una constante de disociación lenta, permitiendo de este modo minimizar la dosis terapéutica eficaz dando como resultado una menor frecuencia de dosificación con dicho anticuerpo que con un anticuerpo que se una a IL-17 con una afinidad menor (es decir, una  $K_D$  superior) y/o tenga una constante de disociación más rápida. Un anticuerpo específico de IL-17 con afinidad alta es también deseable porque puede permitir que el anticuerpo se administre a un paciente subcutáneamente en vez de intravenosamente. Existe también la necesidad de un anticuerpo específico de IL-17 con un valor de  $CI_{50}$  bajo en un ensayo de bioactividad de IL-17 con el fin de generar un anticuerpo anti-IL-17 terapéutico con una dosis terapéutica eficaz mínima. También es deseable proporciona un anticuerpo específico de IL-17 con el que se reduzca a un mínimo la respuesta inmunitaria al anticuerpo evocada por un paciente que recibe el anticuerpo. La presente invención satisface estas necesidades y proporciona ventajas asociadas.

### Sumario de la invención

25 El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo como información.

30 Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales anti-IL-17 quiméricos, humanizados o totalmente humanos, y porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen a epítopes no lineales que comprenden los aminoácidos de IL-17 DGNVDYH (SEC ID Nº: 276) y antagonizan o neutralizan al menos una actividad biológica *in vitro* o *in vivo* asociada con IL-17 o con una porción de la misma.

En una realización, los anticuerpos de la invención tienen una  $CI_{50}$  inferior o igual a aproximadamente 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600pM, 560 pM o 500 pM en un ensayo indicador de IL-8 *in vitro* tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6A del presente documento o inferior o igual a 560 pM en un ensayo indicador de  $GRO\alpha$  *in vitro* tal como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 6B del presente documento.

35 En otra realización, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una afinidad de unión ( $K_D$ ) fuerte por IL-17 humana, es decir, inferior a aproximadamente 7 pM, 6,5 pM, 6,0 pM, 5,5 pM, 5,0 pM, 4,5 pM o 4,0 pM. Alternativamente, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una  $K_D$  por IL-17 humana no superior a aproximadamente 7 pM, 6,5 pM, 6,0 pM, 5,5 pM, 5,0 pM, 4,5 pM o preferentemente no superior a aproximadamente 4,0 pM. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se caracterizan también por una constante de disociación  $k_{off}$  de IL-17 humana inferior a  $2 \times 10^{-5} s^{-1}$ .

40 En otra realización, un anticuerpo anti-IL-17 de la invención se caracteriza porque se une específicamente a IL-17 humana así como a IL-17 de mono cynomolgus, mientras que no se une a IL-17 de ratón o rata a niveles superiores al nivel de fondo. Adicionalmente, un anticuerpo anti-IL-17 de la invención se une a IL-17 (es decir, IL-17A) humana pero no se une a IL-17B, C, D, E o F humana.

45 En una realización, un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención comprende un polipéptido de la región variable de cadena ligera ("LCVR") que comprende 3 secuencias de la CDR que están presentes juntas en un Fab enumerado más adelante en la tabla 3 y que están presentes en el anticuerpo de la invención en la misma posición de la CDR que en el Fab enumerado en la tabla 3. Preferentemente, un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención comprende un polipéptido de la LCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID Nº: 178-243.

50 Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado anti-IL-17, comprendiendo dicho anticuerpo:

a) un péptido con SEC ID Nº: 131 en la CDRL1.

b) un péptido con SEC ID Nº: 167 en la CDRL2.

c) un péptido con SEC ID N°: 168 en la CDRL3.

d) un péptido con SEC ID N°: 26 en la CDRH1.

e) un péptido con SEC ID N°: 30 en la CDRH2, y

f) un péptido con SEC ID N°: 52 en la CDRH3.

- 5 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal anti-IL-17 humanizado según la presente invención comprende una LCVR con SEC ID N°: 241 y una HCVR con SEC ID N°: 118.

Un anticuerpo humanizado según la presente invención es un anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo sustancialmente intacto, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento Fv monocatenario.

- 10 Preferentemente, el anticuerpo según la presente invención comprende una región constante de cadena pesada seleccionada entre IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA, IgE, IgM e IgD.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende un anticuerpo según la presente invención, comprendiendo además dicha composición un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo según la presente invención para su uso como medicamento.

- 15 Preferentemente, el anticuerpo según la presente invención se usa en el tratamiento de una o varias afecciones seleccionadas entre artritis reumatoide, trastorno inflamatorio del intestino, psoriasis y esclerosis múltiple.

- 20 En otra realización, un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención comprende un polipéptido de la región variable de cadena pesada ("HCVR") que comprende 3 CDR que están presentes juntas en un Fab enumerado más adelante en la tabla 2 y que están presente en el anticuerpo de la invención en la misma posición de la CDR que en el Fab enumerado en la tabla 2. Preferentemente, un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención comprende un polipéptido de la HCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 56-121.

- 25 En otra realización, un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención comprende un polipéptido de la LCVR que comprende 3 CDR que están presentes juntas en un Fab enumerado en la tabla 3 y que están presentes en el anticuerpo de la invención en la misma posición de la CDR que en el Fab enumerado en la tabla 3 y además comprende un polipéptido de la HCVR que comprende 3 CDR que están presentes juntas en un Fab enumerado en la tabla 2 y que están presentes en el anticuerpo de la invención en la misma posición de la CDR que en el Fab enumerado en la tabla 2. Preferentemente, las 6 CDR de un anticuerpo de la invención, o fragmento funcional del mismo, están presentes juntas en un Fab enumerado más adelante en la tabla 1 y están presentes en el anticuerpo de la invención en la misma posición de la CDR que en el Fab enumerado en la tabla 1.

- 30 En una realización preferente, un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención comprende (i) un polipéptido de la LCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 178-243 y (ii) un polipéptido de la HCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 56-121. En una realización más preferente, un anticuerpo de la invención que comprende un polipéptido de la LCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 178-243 comprende además el polipéptido de la HCVR seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 56-121 que está presente en un Fab enumerado en la tabla 1 que comprende la LCVR particular presente en el anticuerpo.

- 35 En otra realización, un anticuerpo monoclonal de la invención es uno que puede competir por la unión a IL-17 humana, o una porción de IL-17 humana, con un anticuerpo competidor, comprendiendo el anticuerpo competidor dos polipéptidos con las secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 241 y 118.

- 40 En otra realización, una LCVR de un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención comprende 1, 2 ó 3 péptidos, preferentemente 3 péptidos, seleccionados del grupo que consiste en péptidos con una secuencia tal como se muestra en (a) SEC ID N°: 122-149; (b) SEC ID N°: 150-167 y (c) SEC ID N°:168-177 (es decir, un péptido de (a), un péptido de (b) y un péptido de (c) para un anticuerpo que comprende 3 de dichos péptidos). Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 122-149, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDRL1. Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 150-167, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDRL2. Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 150-167, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDRL3.

- 45 En otra realización, una HCVR de una anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención comprende 1, 2 ó 3 péptidos, preferentemente 3 péptidos, seleccionados del grupo que consiste en péptidos con una secuencia tal como se muestra en (a) SEC ID N°: 11-28; (b) SEC ID N°: 29-32 y (c) SEC ID N°: 33-55 y 261 (es decir, un péptido de (a), un péptido de (b) y un péptido de (c) para un anticuerpo que comprende 3 de dichos péptidos). Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 11-28, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDRH1. Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 29-32, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDRH2. Un

péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 33-55 y 261, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDRH3.

La presente invención proporciona también un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 que comprende seis péptidos seleccionados del grupo que consiste en péptidos con una secuencia tal como se muestra en (a) SEC ID N°: 122-149; (b) SEC ID N°: 150-167, (c) SEC ID N°: 168-177, (d) SEC ID N°: 11-28; (e) SEC ID N°: 29-32 y (f) SEC ID N°: 33-55 y 261 (es decir, un péptido de cada uno de (a-f)); preferentemente los seis péptidos coexisten en un Fab enumerado en la tabla 1 del presente documento. Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 122-149, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDRL1. Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 150-167, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDRL2. Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 150-167, cuando está presente en un anticuerpo de la invención, está en la CDRL3. Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 11-28, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDRH1. Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 29-32, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDRH2. Un péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 33-55 y 261, cuando está presente en dicho anticuerpo, está en la CDRH3.

La presente invención proporciona también un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 que comprende los seis péptidos con las secuencias tal como se muestran en SEC ID N°: 247, 248, 249, 244, 245 y 246. El péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 247 está en la CDRL1. El péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 248 está en la CDRL2. El péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 249 está en la CDRL3. El péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 244 está en la CDRH1. El péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 245 está en la CDRH2. El péptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 246 está en la CDRH3.

Un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención puede comprender, o consta de, un anticuerpo intacto (es decir, de longitud completa), o un anticuerpo sustancialmente intacto o una porción de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento Fv monocatenario. Además, un anticuerpo de la invención puede estar marcado con una marca detectable, inmovilizado en una fase sólida y/o conjugado con un compuesto heterólogo, por ejemplo una enzima, toxina o molécula de polietilenglicol.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento de preparación de un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención que comprende mantener una célula huésped de la invención (es decir, célula huésped que se ha transformado, transducido o infectado con un vector (o vectores) de la invención que expresa un anticuerpo de la invención) en condiciones apropiadas para la expresión de un anticuerpo monoclonal de la invención, con lo que se expresa dicho anticuerpo. El procedimiento puede comprender además la etapa de aislar el anticuerpo monoclonal de la invención a partir de la célula o, preferentemente, a partir de los medios de cultivo en los que se cultiva la célula.

Se contemplan usos diagnósticos para anticuerpos monoclonales de la invención. En una aplicación diagnóstica, la invención proporciona un procedimiento para determinar el nivel de proteína IL-17 en una muestra que comprende exponer una muestra que se va a analizar a un anticuerpo anti-IL-17 de la invención en condiciones de unión y determinar la unión específica del anticuerpo a la muestra. Un anticuerpo anti-IL-17 de la invención puede usarse para determinar los niveles de IL-17 en muestras de ensayo comparando valores de la muestra de ensayo en una curva estándar generada mediante la unión de dicho anticuerpo a muestras con cantidades conocidas de IL-17. La invención también proporciona un kit que comprende un anticuerpo de la invención y, preferentemente, instrucciones para usar el anticuerpo para detectar proteína IL-17 en una muestra.

La invención proporciona una composición, preferentemente una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención. La composición farmacéutica de la invención puede comprender también un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. En dicha composición farmacéutica, el anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención es el único ingrediente activo. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende una población homogénea o sustancialmente homogénea de un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención. La composición para uso terapéutico es fisiológicamente compatible, estéril y puede liofilizarse y opcionalmente suministrarse con un diluyente apropiado.

En el presente documento se divulga un procedimiento para inhibir al menos una bioactividad de IL-17 en un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano, con necesidad de ello, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz, o cantidad neutralizante de IL-17, de un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención a dicho animal. En el presente documento se divulga también un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno mejorado por la neutralización o antagonización de una bioactividad de IL-17, por ejemplo inhibiendo la transducción de la señal resultante de la unión de IL-17 a su receptor, que comprende administrar a un paciente (por ejemplo un ser humano) con necesidad de dicho tratamiento o prevención una cantidad terapéuticamente eficaz de una cantidad neutralizante de IL-17, de un anticuerpo monoclonal de la invención.

Una realización de la invención es un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para la administración a un mamífero, preferentemente un ser humano, para el tratamiento de, por ejemplo, un trastorno autoinmunitario o un trastorno inflamatorio o trastorno de proliferación celular.

La invención también proporciona un artículo manufacturado que comprende un material de envasado y un anticuerpo de la invención contenido en dicho material de envasado, en el que el material de envase comprende un prospecto de envasado que indica que el anticuerpo neutraliza específicamente la actividad de la IL-17 o reduce el nivel de la IL-17 funcional presente en el sistema.

5 La invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican un anticuerpo de la invención o cadena ligera o cadena pesada del mismo; un vector (o vectores) que comprende dicho ácido nucleico, opcionalmente unido operativamente a secuencias control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; una célula huésped que comprende ese vector; un procedimiento para producir un anticuerpo de la invención que comprende cultivar la célula huésped de modo que se exprese el ácido nucleico y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo a partir del medio de cultivo de la célula huésped.

10 La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican IL-17 de mono cynomolgus (SEC ID N°: 253) o IL-17 de conejo (SEC ID N°: 251); la proteína IL-17 codificada por el ácido nucleico de mono o conejo (SEC ID N°: 10 ó 9 respectivamente); vectores que comprende dicha molécula de ácido nucleico; la célula huésped que comprende dicho vector; y un procedimiento para producir IL-17 de mono cynomolgus o IL-17 de conejo.

### Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos de miembros de la familia de proteínas IL-17 humanas (IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E y IL-17F).

20 La FIG. 2 muestra el alineamiento de secuencias de aminoácidos de IL-17 humana, de conejo, de rata, de mono cynomolgus y de especies murinas.

### Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones y cualquier información que no entre dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo como información.

25 La invención presenta anticuerpos monoclonales anti-IL-17 quiméricos, humanizados o totalmente humanos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, capaces de neutralizar o antagonizar al menos una actividad de IL-17 *in vitro* y/o *in vivo*. Preferentemente, dichos anticuerpos de la invención se caracterizan también por tener una  $CI_{50}$  inferior a aproximadamente 600 ó 560 pM en, por ejemplo, un ensayo indicador de IL-8 *in vitro* o ensayo indicador de  $GRO\alpha$  (véase, por ejemplo, el ejemplo 6) y/o preferentemente tiene una afinidad de unión con IL-17 inferior a 4 pM. Los anticuerpo de la invención se caracterizan además porque se unen específicamente a IL-17 humana y de mono cynomolgus (SEC ID N°: 1 y 10 respectivamente) pero no se une a IL-17 murino o de rata (SEC ID N°: 7 y 8 respectivamente). El epítoto antigénico al que se unen anticuerpo monoclonales de la invención es un epítoto no lineal de IL-17 humana (y de mono) y comprende los restos DGNVDYH (SEC ID N°: 276) de la IL-17. Un anticuerpo de la invención entra en contacto con el péptido DGNVDYH (SEC ID N°: 276) cuando está en el contexto de la IL-17 de longitud completa.

### Definiciones

35 La "interleucina 17" también denominada "IL-17" o "IL-17A" es una proteína homodimérica glucosilada de 20-30 kD. El gen IL-17 humano codifica una proteína de 155 aminoácidos que tiene una secuencia de señal de 19 aminoácidos y un segmento maduro de 136 aminoácidos. La IL-17 humana muestra una identidad de secuencia de aminoácidos del 62,5 % y del 58 % con las secuencias de aminoácidos de IL-17 de ratón y de rata, respectivamente, tal como se muestra en la figura 2. La IL-17 humana muestra una identidad de secuencia de aminoácidos del 97,4 % con la IL-17 de mono cynomolgus.

40 Un anticuerpo de longitud completa tal como existe en la naturaleza es una molécula de inmunoglobulina que comprende cuatro cadenas peptídicas, dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa cuando la longitud es completa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa cuando la longitud es completa) interconectadas mediante enlaces disulfuro. La porción del extremo amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento de los antígenos. La porción del extremo carboxi terminal de cada cadena define una región constante que es principalmente responsable de la función efectora.

45 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda y se caracterizan por una región constante particular. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (en el presente documento "LCVR") N-terminal y una región constante de cadena ligera que comprende por un dominio, CL. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, y definen el isótopo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD y IgE, respectivamente, y varios de éstos pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos) por ejemplo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Cada tipo de cadena pesada está caracterizado por una región constante particular. Cada cadena pesada consta de una región variable de cadena pesada N-terminal (en el presente documento "HCVR") y una región

constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios (CH1, CH2 y CH3) para IgG, IgD y IgA; y de 4 dominios (CH1, CH2, CH3 y CH4) para IgM e IgE.

Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), intercaladas entre regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales ("FR"). Cada HCVR y cada LCVR está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas partiendo del extremo amino terminal hacia el extremo carboxi terminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Para anticuerpos de longitud completa de la invención las cadenas ligeras comprenden preferentemente, cadena abajo de la FR4, un polipéptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 277. Para anticuerpos de longitud completa de la invención las cadenas pesadas comprenden preferentemente, cadena abajo de la FR4, un polipéptido con la secuencia mostrada en SEC ID N°: 278. En el presente documento, las 3 CDR de la cadena pesada se denominan "CDRH1, CDRH2 y CDRH3" y las 3 CDR de la cadena ligera se denominan "CDRL1, CDRL2 y CDRL3." Las CDR contienen la mayor parte de los restos que forman interacciones específicas con el antígeno. La numeración y ubicación de restos de aminoácido de la CDR dentro de las regiones HCVR y LCVR está de acuerdo con la convención de numeración, bien conocida, de Kabat.

El término "anticuerpo", con referencia a un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención (o simplemente "anticuerpo de la invención"), tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal. Un "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo de roedor, preferentemente murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo totalmente humano, a menos que se indique otra cosa en el presente documento. Los anticuerpo monoclonales de la invención pueden producirse usando, por ejemplo, técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, así como tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación en fagos, tecnologías sintéticas o recombinantes o combinaciones de dichas tecnologías muy conocidas en la técnica. La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, no está limitada a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. "Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que está derivado de una copia única o clon, incluido cualquier clon de eucariota, procariota o fago, y no al procedimiento por el que se produce. Un "anticuerpo monoclonal" puede ser un anticuerpo intacto (que comprende una región Fc completa o de longitud completa), un anticuerpo sustancialmente intacto o una porción o fragmento de un anticuerpo que comprende una porción de unión a antígeno, por ejemplo un fragmento Fab, fragmento Fab' o fragmento F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo murino o de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. El fragmento "Fab" contiene un dominio variable y constante de la cadena ligera y un dominio variable y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos de anticuerpo "F(ab')<sub>2</sub>" comprenden un par de fragmentos Fab que están generalmente unidos covalentemente cerca de sus extremos carboxi terminales mediante cisteínas bisagras entre los mismos. También se conocen en la técnica otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpos.

La región variable de cada cadena ligera-pesada forma un sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión a antígeno del anticuerpo son el mismo. Tal como se usa en el presente documento, la "porción de unión al antígeno" o "región de unión al antígeno" o "dominio de unión al antígeno" se refiere de forma intercambiable a esa porción de una molécula de anticuerpo que contiene los restos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al anticuerpo su especificidad y afinidad por el antígeno. La porción de anticuerpo incluye el "marco estructural" de restos de aminoácidos necesarios para mantener la conformación apropiada de los restos de unión a antígeno. Preferentemente, las CDR de la región de unión al antígeno de los anticuerpos de la invención son total o sustancialmente de origen murino, opcionalmente con determinados restos de aminoácidos alterados, por ejemplo sustituidos con un resto de aminoácido diferente (véanse, por ejemplo, las tablas 2 y 3) para optimizar una propiedad particular del anticuerpo, por ejemplo, K<sub>D</sub>, k<sub>off</sub>, CI<sub>50</sub>. Preferentemente, las regiones estructurales de anticuerpos de la invención son de origen humano o sustancialmente de origen humano (al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de origen humano). Las regiones estructurales preferentes de anticuerpos de la invención tienen las secuencias siguientes: SEC ID N°: 262 (FR1 de HCVR), 263 (FR2 de HCVR), 264 (FR3 de HCVR), 265 (FR4 de HCVR), 266 (FR1 de LCVR), 267 (FR2 de LCVR), 268 (FR3 de LCVR), 269 (FR4 de LCVR) y siguen la numeración de Kabat. En otras realizaciones, la región de unión al antígeno de un anticuerpo IL-17 de la invención puede derivarse de otras especies no humanas, incluidas, pero sin limitarse a, conejo, rata o hámster. Alternativamente, la región de unión al antígeno puede derivarse de la secuencia humana.

Además, un "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, puede ser un Fv monocatenario que puede producirse uniendo el ADN que codifica una LCVR y el ADN que codifica una HCVR con una secuencia enlazadora. (Véase, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore ed., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315, 1994). Se entiende que independientemente de si se especifican fragmentos, el término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, incluye dichos fragmentos así como formas monocatenarias. Siempre que la proteína retenga la capacidad para unirse específica o de forma preferencial a su diana pretendida (es decir, epítope o antígeno), está incluida dentro del término "anticuerpo". Los anticuerpos pueden o no pueden estar glucosilados y entrar aún dentro de los límites de la invención.

Una población de "anticuerpos monoclonales" se refiere a una población de anticuerpos homogénea o sustancialmente homogénea (es decir, al menos aproximadamente el 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 97 % o 98 % o del modo más preferente al menos el 99

% de los anticuerpos en la población competiría en un ensayo ELISA por el mismo antígeno o epítipo o más preferentemente los anticuerpos son idénticos en la secuencia de aminoácidos. Los anticuerpos pueden o no pueden estar glucosilados y entrar aún en los límites de la invención. Los anticuerpos monoclonales pueden ser homogéneos si tienen secuencias de aminoácidos idénticas aunque puedan diferir en una modificación postraduccional, por ejemplo, el patrón de glucosilación.

Una "variante" de anticuerpo se refiere, en el presente documento, a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo "parental" por virtud de adición, delección y/o sustitución de uno o varios restos de aminoácidos de la secuencia del anticuerpo parental. En una realización preferente, la variante de anticuerpo comprende al menos una adición, delección y/o sustitución de aminoácidos (por ejemplo, de una a aproximadamente diez, y preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8) en las regiones CDR del anticuerpo parental. La identidad u homología con respecto a la secuencia de la variante de anticuerpo se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia de la variante de anticuerpo que son idénticas a los restos del anticuerpo parental después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. La variante de anticuerpo mantiene la capacidad de unión con el antígeno, o preferentemente, el epítipo, al que se une al anticuerpo parental y preferentemente tiene al menos una propiedad o bioactividad que es superior a la del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante de anticuerpo tiene preferentemente una afinidad de unión más fuerte, una constante de disociación más lenta, una  $CI_{50}$  inferior o una capacidad potenciada para inhibir la bioactividad del antígeno que las del anticuerpo parental. Una variante de anticuerpo de particular interés en el presente documento es una que presenta al menos aproximadamente una propiedad o bioactividad potenciada 2 veces, preferentemente al menos 5 veces, 10 veces o 20 veces en comparación con el anticuerpo parental.

El anticuerpo "parental", en el presente documento, es uno que está codificado por una secuencia de aminoácidos usados para la preparación de una variante de anticuerpo. El anticuerpo parental puede tener una secuencia estructural de origen murino, pero preferentemente la secuencia estructural es total o sustancialmente de origen humano. El anticuerpo parental puede ser un anticuerpo murino, quimérico, humanizado o humano.

La expresión "se une específicamente", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no se une significativamente a moléculas diferentes a su(s) asociado(s) de unión específico(s). La expresión también es aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención es específico de un epítipo particular portado por una serie de antígenos, en cuyo caso el anticuerpo específico que porta el dominio de unión al antígeno será capaz de unirse a diversos antígenos que portan el epítipo. En consecuencia, un anticuerpo monoclonal de la invención se une específicamente a IL-17 humana (es decir, IL-17A) aunque no se una específicamente a IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F humanas. Además, un anticuerpo monoclonal de la invención se une específicamente a IL-17 humana y a IL-17 de mono cynomolgus pero no se une específicamente a IL-17 de rata o IL-17 murina. Además, un anticuerpo monoclonal de la invención se une específicamente a un epítipo de IL-17 humana no lineal o conformacional que comprende los aminoácidos DGNVDYH (SEC ID N°: 276) pero no se une a un epítipo de IL-17 humana que no comprende los aminoácidos DGNVDYH (SEC ID N°: 276).

La expresión "se une de forma preferencial", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una situación en la que un anticuerpo se une a un antígeno específico al menos aproximadamente el 20 % más, preferentemente al menos el 50 % más, 2 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces más que lo que se une a un antígeno diferente al medir mediante técnicas disponibles en la técnica, por ejemplo, ensayo ELISA de competencia o de medición de  $K_D$  con un BIACORE o KINEXA. Un anticuerpo puede unirse de forma preferencial a un epítipo dentro de un antígeno más que a epítipos diferentes dentro del mismo antígeno. En consecuencia, un anticuerpo de la invención se une de forma preferencial a IL-17 humano más que a IL-17 de conejo.

El término "epítipo" se refiere a esa porción de una molécula capaz de ser reconocida por, y unirse a, un anticuerpo en una o varias regiones de unión a antígeno del anticuerpo. Los epítipos constan a menudo de una agrupación de moléculas superficiales químicamente activas tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Por "epítipo inhibidor" y/o "epítipo neutralizador" se quiere decir un epítipo que, en el contexto de la molécula antigénica intacta y cuando se une a un anticuerpo específico del epítipo, da como resultado una pérdida o disminución de la actividad biológica de la molécula *in vivo* o *in vitro* o en un organismo que contiene la molécula.

El término "epítipo," tal como se usa en el presente documento, se refiere además a un polipéptido que tiene actividad antigénica y/o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, por ejemplo un ratón o un ser humano. La expresión "epítipo antigénico", tal como se usa en el presente documento, se define como una porción de un polipéptido a la que se puede unir específicamente un anticuerpo tal como se determina por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo, por inmunoanálisis convencional. Los epítipos antigénicos no deben ser necesariamente inmunogénicos, pero pueden ser inmunogénicos. Un "epítipo inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, se define como una porción de un polipéptido que desencadena una respuesta del anticuerpo en un animal, tal como se determina mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Un "epítipo no lineal" o "epítipo conformacional" comprende polipéptidos (o aminoácidos) no contiguos de la proteína antigénica a la que se une un anticuerpo específico del epítipo.

Las expresiones "propiedad biológica" o "característica biológica" o los términos "actividad" o "bioactividad", con referencia a un anticuerpo de la presente invención, se usan en el presente documento de forma intercambiable e incluyen, pero no están limitadas a, afinidad y especificidad epítopo/antígeno, capacidad para neutralizar o antagonizar la actividad de IL-17 *in vivo* o *in vitro*,  $Cl_{50}$ , estabilidad *in vivo* del anticuerpo y las propiedades inmunogénicas del anticuerpo. Otras propiedades o características biológicas identificables de un anticuerpo reconocidas en la técnica incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada (es decir, con homólogos no humanos del péptido diana o con otras proteínas o tejidos, generalmente) y la capacidad para conservar niveles de expresión altos de proteínas en células de mamífero. Las propiedades y características mencionadas anteriormente pueden observarse, medirse o evaluarse usando técnicas reconocidas incluidas, pero sin limitarse a, ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia de plasmón superficial por BIACORE o KINEXA, ensayos de neutralización *in vitro* o *in vivo* sin límite, unión al receptor, producción y/o secreción de citocinas o factores del crecimiento, transducción de señal e inmunohistoquímica con secciones de tejidos de diferentes fuentes incluidas ser humano, primate o cualquier otra fuente.

Los términos "inhibe" o "neutraliza", tal como se usan en el presente documento, con respecto a la actividad de un anticuerpo de la invención significan la capacidad para antagonizar, prohibir, prevenir, reprimir, ralentizar, interrumpir, eliminar, detener o invertir sustancialmente, por ejemplo, la progresión o gravedad de la actividad que está siendo inhibida que incluye, pero no está limitada a, una actividad o propiedad biológica (por ejemplo, la actividad de IL-17), una enfermedad o una afección. La inhibición o neutralización de la actividad de la IL-17 resultante de la unión de un anticuerpo de la invención con la IL-17 es preferentemente de al menos aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o superior.

El término "aislado", cuando se usa con relación a un ácido nucleico o proteína (por ejemplo, un anticuerpo), se refiere a una molécula de ácido nucleico o proteína que se ha identificado y separado de al menos un contaminante con el que está asociada ordinariamente en su fuente natural. Preferentemente, una "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tengan diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un anticuerpo aislado que se une específicamente a IL-17 y que está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes al IL-17).

Las expresiones "numeración de Kabat" y "etiquetado de Kabat" se usan en el presente documento de forma intercambiable. Estas expresiones, que son reconocidas en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de restos de aminoácido que son más variables (es decir, hipervariables) que otros restos de aminoácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo (Kabat y col., Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971); Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos, Publicación NIH N° 91-3242 (1991)).

Un polinucleótido está "unido operativamente" a otro polinucleótido cuando está dispuesto en una relación funcional con el otro polinucleótido. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de una secuencia. Un péptido está "unido operativamente" a otro péptido cuando los polinucleótidos que los codifican están unidos operativamente, preferentemente se encuentran en el mismo marco de lectura abierta.

Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a un mamífero, incluidos, pero sin limitarse a, murinos, simios, seres humanos, animales mamíferos de granja, animales mamíferos de deportes y mamíferos mascotas; los términos se refieren preferentemente a seres humanos. En una realización determinada, el sujeto, preferentemente un mamífero, preferentemente un ser humano, se caracteriza además por una enfermedad o trastorno o afección que se beneficiaría de una bioactividad de la IL-17 reducida.

El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido incluidos, pero sin limitarse a, plásmidos y vectores víricos. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se han introducido mientras que otros vectores pueden integrarse en el genoma de una célula huésped después de su introducción en la célula huésped y, por lo tanto, se replican junto con el genoma huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión") y se conocen bien en la técnica ejemplos de vectores.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "célula", "célula huésped", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de forma intercambiable e incluyen una célula o cultivo celular que es un receptor de cualquier polinucleótido aislado de la invención o cualquier vector (o vectores) recombinante que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo HCVR, LCVR o monoclonal de la invención. Las células huésped incluyen progenie de una célula huésped única y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en ADN complementario total) a la célula parental original debido a mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado. Una célula huésped incluye células transformadas, transducidas o infectadas con un vector recombinante o un polinucleótido que expresa un anticuerpo monoclonal de la invención o una cadena ligera o una cadena pesada del mismo. Una célula huésped que comprende un vector recombinante de la invención, bien

incorporado de forma estable en el cromosoma huésped o no, también puede denominarse una "célula huésped recombinante". Las células huésped preferentes para su uso en la invención son células de CHO (por ejemplo, ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0, células COS (ATCC, por ejemplo, CRL-1650, CRL-1651) y HeLa (ATCC CCL-2). Las células huésped adicionales para su uso en la invención incluyen células vegetales, células de levadura, células de otros mamíferos y células procarióticas.

#### Caracterización de anticuerpos

La presente invención se refiere a anticuerpos aislados, monoclonales que se unen específicamente a IL-17 humana (es decir, IL-17A) con alta afinidad. Los anticuerpos de la invención son preferentemente anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos o porciones de unión a antígeno. Además, los anticuerpos de la invención neutralizan o antagonizan al menos una actividad biológica de IL-17 *in vivo* y/o *in vitro*. La unión específica de un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención, (incluidas porciones de unión a antígeno del mismo), a la IL-17 permite a dicho anticuerpo usarse como producto terapéutico para enfermedades y trastornos asociados a la IL-17, es decir, afecciones, enfermedades o trastornos que se benefician de la inhibición de una actividad biológica de la IL-17.

El epítipo antigénico al que se unen anticuerpo de la invención es un epítipo no lineal que comprende los restos de aminoácidos ADGNVDYHNM (SEC ID N°: 275), más preferentemente los restos de aminoácidos DGNVDYH (SEC ID N°: 276) de IL-17 humana. Los anticuerpos que se unen a dicho epítipo, específicamente y de forma preferencial se unen a IL-17 humana e IL-17 de mono cynomolgus en comparación con su unión a IL-17 murino o IL-17 de rata. Los anticuerpos monoclonales de la invención se unen a IL-17 humana al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces más (por ejemplo, afinidad superior o especificidad superior) que lo que se unen a IL-17 murina o IL-17 de rata; más preferentemente al menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 veces más que lo que se unen a IL-17 murino o IL-17 de rata, incluso más preferentemente, no se unen a IL-17 murina o IL-17 de rata a niveles superiores a los niveles de fondo tal como se determina, por ejemplo, mediante ensayo ELISA, ensayo de ELISA de competencia o valores  $K_D$  en un ensayo con BIACORE o KINEXA.

En una realización preferente, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 que posee una afinidad de unión fuerte por IL-17 humana, es decir, se une a IL-17 humana o a una porción de la misma que comprende DGNVDYH (SEC ID N°: 276) [es decir, anticuerpo que entra en contacto con el polipéptido DGNVDYH (SEC ID N°: 276)], con una afinidad de unión ( $K_D$ ) para IL-17 humana de menos de aproximadamente 7 pM, 6,5 pM o 6 pM, preferentemente menos de aproximadamente 5,5 pM, 5 pM o 4,5 pM y del modo más preferente menos de aproximadamente 4 pM. Alternativamente, los anticuerpos de la invención se caracterizan por una  $K_D$  por IL-17 humana no superior a aproximadamente 7 pM, 6,5 pM o 6 pM o preferentemente no superior a aproximadamente 5,5 pM, 5,0 pM, 4,5 pM o preferentemente no superior a aproximadamente 4,0 pM. Las afinidades de los anticuerpos pueden determinarse tal como se describe más adelante en los ejemplos u otros procedimientos disponibles en la técnica. Preferentemente, los anticuerpos anti-IL-17 de la invención que poseen una afinidad de unión fuerte tal como se ha descrito anteriormente también se unen a un epítipo de IL-17 humana no lineal que comprende los aminoácidos ADGNVDYHNM (SEC ID N°: 275), más preferentemente los restos de aminoácidos DGNVDYH (SEC ID N°: 276), entrando el anticuerpo en contacto con el polipéptido DGNVDYH (SEC ID N°: 276).

En una realización, los anticuerpos de la invención tienen una constante de disociación ( $k_{off}$ ) para IL-17 humana inferior a  $5 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  o  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . En una realización preferente, los anticuerpos de la invención se caracterizan por poseer una afinidad de unión fuerte por IL-17 humana tal como se ha descrito anteriormente ( $K_D$  inferior a aproximadamente 7 pM o 6 pM, preferentemente inferior a 5 pM o 4,5 pM y del modo más preferente inferior a aproximadamente 4 pM) también tienen una constante de disociación ( $k_{off}$ ) para IL-17 humana inferior a  $5 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  o  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  e incluso más preferentemente se une también a un epítipo de IL-17 humana no lineal que comprende los aminoácidos ADGNVDYHNM (SEC ID N°: 275), más preferentemente los restos de aminoácidos DGNVDYH (SEC ID N°: 276) de la IL-17 humana.

En otra realización, los anticuerpos de la invención tienen una  $CI_{50}$  inferior a InM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM o 500 pM en, por ejemplo, un ensayo indicador de IL-8 *in vitro* o inferior a 560 pM en un ensayo indicador de GRO $\alpha$  (véase el ejemplo 6). En una realización preferente, los anticuerpos de la invención están caracterizados por poseer una afinidad de unión fuerte por la IL-17 humana tal como se ha descrito anteriormente ( $K_D$  inferior a aproximadamente 7 pM o 6 pM, preferentemente inferior a 5 pM o 4,5 pM y del modo más preferente inferior a aproximadamente 4 pM) y también tienen una  $CI_{50}$  inferior a InM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM o 500 pM en, por ejemplo, un ensayo indicador de IL-8 *in vitro* o inferior a 560 pM en un ensayo indicador de GRO $\alpha$  e incluso más preferentemente también tienen una constante de disociación ( $k_{off}$ ) para IL-17 humana inferior a  $5 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  o  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  e incluso más preferentemente se une también a un epítipo de IL-17 humana no lineal que comprende los aminoácidos DGNVDYH (SEC ID N°: 276) de la IL-17 humana, entrando el anticuerpo en contacto con el polipéptido DGNVDYH (SEC ID N°: 276).

La realización más preferente de la invención es un anticuerpo anti-IL-17 que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que consiste en SEC ID N°: 279 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que consiste en SEC ID N°: 280. Preferentemente este anticuerpo comprende dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Preferentemente la cadena ligera con la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEC ID N°: 279 está codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia mostrada en SEC ID N°: 281

(incluida la secuencia de señal) o SEC ID N°: 283 (sin la secuencia de señal). Preferentemente la cadena pesada con la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEC ID N°: 280 está codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia mostrada en SEC ID N°: 282 (incluida la secuencia de señal) o SEC ID N°: 284 (sin la secuencia de señal).

5 Los anticuerpos monoclonales ("mAb") pueden fabricarse usando el procedimiento de hibridoma ampliamente conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler y col., Nature, 256:495, 1975) o pueden fabricarse mediante procedimientos de ADN recombinante (por ejemplo como en el documento de patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Generalmente, un hibridoma puede producirse fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como SP2/0) con células productoras de anticuerpo del animal inmunizado. 10 La célula productora de anticuerpo, preferentemente las del bazo o de los ganglios linfáticos, se obtienen a partir de animales inmunizados con el antígeno de interés. Las células fusionadas (hibridomas) pueden aislarse usando condiciones de cultivo selectivas y pueden clonarse mediante dilución limitante. El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de mAb producido por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo o ELISA. Las células que producen anticuerpo con las propiedades de unión deseadas pueden seleccionarse mediante un ensayo adecuado. Los procedimientos para dicho aislamiento y análisis son bien conocidos en la técnica.

Pueden usarse otros procedimientos adecuados de producción o aislamiento de anticuerpos de la invención, incluidos anticuerpos humanos o artificiales, incluidos, por ejemplo, procedimientos que seleccionan un anticuerpo recombinante (por ejemplo, Fv o Fab monocatenario) a partir de una biblioteca, o que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) capaces de producir un repertorio de anticuerpos (véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555, 1993; Jakobovits y col., Nature, 362:255-258, 1993; documentos de patente de Estados Unidos N° 5.545.806 y 5.545.807).

25 Los anticuerpos monocatenarios y los anticuerpos quiméricos, humanizados o primatizados (injertados a la CDR), así como anticuerpos monocatenarios quiméricos o injertados a la CDR, y similares, que comprenden porciones derivadas de diferentes especies, también están abarcados por la presente invención y por el término "anticuerpo". Las diversas porciones de estos anticuerpos pueden unirse conjuntamente químicamente mediante técnicas convencionales, sintéticamente, o pueden prepararse en forma de proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican una cadena quimérica o humanizada pueden expresarse para que produzcan una proteína contigua. Véanse, por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos N° 4.816.567; el documento de patente europea N° 125.023 B1; el documento de patente de Estados Unidos N° 4.816.397; el documento de patente europea N° 120.694 B1; el documento WO 86/01533; el documento de patente europea N° 194.276 B1; el documento de patente de Estados Unidos N° 5.225. 539; el documento de patente europea N° 239.400 B1 y los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.585.089 y 5.698.762.

Además, también pueden producirse fragmentos funcionales de anticuerpos (es decir, fragmentos de unión al antígeno), incluidos anticuerpos quiméricos, humanizados, privatizados o monocatenarios, y entran dentro del alcance de la invención. Los fragmentos funcionales preferentes mantienen una función de unión al antígeno de un anticuerpo de longitud completa correspondiente. Los fragmentos funcionales particularmente preferentes mantienen la capacidad de inhibir una o varias funciones o bioactividades características de una IL-17 madura de mamífero, preferentemente una IL-17 humana, tal como una actividad de unión, una actividad de señalización y/o estimulación o inhibición de una respuesta celular. Por ejemplo, en una realización, un fragmento funcional puede inhibir la interacción de IL-17 madura con su receptor y/o puede inhibir una o varias funciones mediadas por receptor.

Las porciones de anticuerpo capaces de unirse a IL-17 incluyen, pero no están limitadas a, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> y están abarcados por la invención. Dichos fragmentos pueden producirse mediante escisión enzimática o mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina de un anticuerpo intacto puede generar fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>, respectivamente. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab)<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación con antígeno y es aún capaz de un entrecruzamiento con el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de, y unión a, antígeno total. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que los tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Para superar la tendencia de dominios HCVR y LCVR unidos de forma no covalente en el Fv para disociarse cuando se coexpresan en una célula huésped, puede construirse un fragmento Fv monocatenario (Fvmc) en el que un polipéptido flexible y adecuadamente largo une bien el extremo C terminal de la HCVR al extremo N terminal de la LCVR o bien el extremo C terminal de la LCVR al extremo N terminal de la HCVR. Un enlazador usado comúnmente es un péptido de 15 restos (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. Para una revisión de Fvmc, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore ediciones, Springer-Verlag,

Nueva York, páginas 269-315 (1994). Los anticuerpos también pueden producirse en una variedad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que uno o varios codones de detención se han introducido cadena arriba del sitio de detención natural. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de cadena pesada de  $F(ab')_2$  puede diseñarse para que incluya secuencias de ADN que codifican el dominio  $CH_1$  y la región bisagra de la cadena pesada.

La selección de fragmentos de anticuerpos de bibliotecas que usan tecnologías de enriquecimiento tales como presentación en fagos (Matthews DJ y Wells JA. Science. 260:1113-7, 1993), presentación en ribosomas (Hanes y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:14130-5, 1998), presentación bacteriana (Samuelson P.y col., Journal of Biotechnology. 96:129-54, 2002) o presentación en levadura (Kieckhefer M.C. y col., Protein Engineering, 10:1303-10, 1997) han demostrado ser alternativas exitosas a la tecnología de hibridoma clásica (revisión: Little M. y col., Immunology Today, 21:364-70, 2000).

#### Variantes de anticuerpos

Un anticuerpo monoclonal murino o un anticuerpo humano (producido, por ejemplo, en un ratón transgénico) obtenidos contra IL-17 puede ser un anticuerpo parental. Un anticuerpo parental puede alterarse adicionalmente para crear una forma quimérica o humanizada del anticuerpo u otra forma variante del anticuerpo usando procedimientos disponibles en la técnica, por ejemplo, mutagénesis por PCR. Dichos anticuerpos quiméricos, humanizados o de otra variante pueden servir como anticuerpos parentales para una variación o mutagénesis posterior. Los anticuerpos parentales de la invención pueden estar mutagenizados, por ejemplo, dentro del dominio o los dominios de la CDR (véase, por ejemplo, las tablas 2 y 3) para crear variantes de anticuerpo que pueden analizarse para determinar la presencia de una propiedad de interés, por ejemplo, afinidad de unión ( $K_D$  inferior),  $Cl_{50}$ , especificidad, unión preferencial, etc. Preferentemente, la propiedad de interés en la variante del anticuerpo representa una mejora sobre la propiedad del anticuerpo parental. Una sustitución de aminoácidos de la variante del anticuerpo es preferente y tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 restos de aminoácidos de la molécula de anticuerpo parental eliminados y un resto diferente insertado en su sitio. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución es una o varias regiones CDR, pero también se contemplan las alteraciones de la FR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son preferentes; aunque, para más cambios sustanciales, pueden introducirse cambios de aminoácidos no conservativos y analizarse los anticuerpos resultantes para evaluar la propiedad de interés.

Una forma conveniente para generar variantes de sustitución de un anticuerpo parental es la maduración de afinidad usando presentación en fagos. Brevemente, una molécula de polinucleótido que codifica un anticuerpo parental se somete a mutación dentro de una o varias regiones CDR para generar todas las sustituciones de aminoácidos posibles en cada resto de aminoácido en el que se desea una sustitución. Las variantes de anticuerpos así generadas se presentan de forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosas fusionadas con el producto del gen III de M13 introducidas en cada partícula. Después se analizan las variantes de anticuerpo presentados en fagos para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión,  $Cl_{50}$ ). Para identificar sitios de la región CDR candidatos para la modificación, puede realizarse una mutagénesis mediante alanina para identificar los restos de la región CDR que contribuyen de forma significativa a la unión a los antígenos.

Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y la IL-17. Dichos restos de contacto y los restos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en el presente documento o conocidas en la técnica. Alternativamente, o adicionalmente, puede realizarse mutagénesis aleatoria o mutagénesis puntual en una o varias moléculas de polinucleótidos que codifican al menos una CDR. La mutagénesis puede realizarse en una o en varias posiciones, bien mientras la CDR está unida operativamente a la región estructural dentro de la región variable o bien mientras la CDR es independiente de otra secuencia de región variable y después la CDR alterada se hace retornar a la región variable usando tecnología de ADN recombinante. Una vez se han generado dichas variantes de anticuerpo, el panel de variantes se somete a tamizado para determinar una propiedad o actividad de interés y pueden seleccionarse los anticuerpos con mejores propiedades en uno o más ensayos relevantes para su ulterior desarrollo.

Cualquier resto de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada de un anticuerpo anti-IL-17 puede ser sustituido, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir entrecruzamientos aberrantes. A la inversa, pueden añadirse enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar se pretende decir eliminar uno o varios restos carbohidrato que se encuentran en el anticuerpo y/o añadir uno o varios sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo parental. La glucosilación de anticuerpos habitualmente está ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de una de las

azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, lo más habitualmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

5 La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede realizarse mediante la adición o sustitución por uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glucosilación ligados a O).

### Secuencia

10 Un anticuerpo monoclonal preferente de la invención comprende una LCVR que comprende un péptido con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 178-243 y/o una HCVR que comprende un péptido con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 56-121. En una realización preferente, un anticuerpo de la invención comprende una LCVR que comprende un péptido con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 178-243 y/o una HCVR que comprende un péptido con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 56-121, en el que la HCVR y la LCVR presentes en un anticuerpo de la invención existen juntas en un Fab enumerado en la tabla 1. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención que comprende un polipéptido de la LCVR con una secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 178, comprende además preferentemente una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 56, 60, 68-93 y 95. Además, un anticuerpo de la invención que comprende un polipéptido de la LCVR con una secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 241, comprende además preferentemente una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 118 y 106. El experto apreciará que los anticuerpos de la invención no están limitados a las secuencias específicas de HCVR y LCVR tal como se enumeran en la tabla 1 del presente documento, sino que también incluyen variantes de estas secuencias que, cuando están presentes en un anticuerpo anti-IL-17 de la invención, mantienen o mejoran la capacidad de unión al antígeno y al menos otra propiedad funcional del anticuerpo parental, por ejemplo, especificidad del epítipo, capacidad para competir con el anticuerpo parental para unirse a IL-17,  $CI_{50}$  y/o valores de  $K_D$  o  $k_{off}$  para la unión a IL-17 humana.

Además, un anticuerpo monoclonal de la invención es uno que está competitivamente inhibido de su unión a IL-17 humana (o una porción del mismo que comprende DGNVDYH (SEC ID N°: 276)) por un anticuerpo monoclonal competidor, comprendiendo el anticuerpo monoclonal competidor dos polipéptidos con las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 241 (LCVR) y 118 (HCVR). Dicha inhibición competitiva entre anticuerpo puede medirse mediante ensayos de la técnica, por ejemplo, un ensayo ELISA de competencia.

Preferentemente, un anticuerpo de la invención que compite con el anticuerpo competidor definido anteriormente está caracterizado además porque se une específicamente a IL-17 humana, pero no se une a IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F humanas. Adicionalmente, el anticuerpo se caracteriza además por unirse específicamente a IL-17 humana e IL-17 de mono cynomolgus, pero no se une a IL-17 de rata o IL-17 de ratón a niveles superiores al nivel de fondo.

Más preferentemente, un anticuerpo de la invención que compite por la unión a IL-17 humana con un anticuerpo competidor que comprende secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 241 y 118 está caracterizado además porque se une a un epítipo no lineal de IL-1 humana que comprende los aminoácidos DGNVDYH (SEC ID N°: 276). Incluso más preferentemente, un anticuerpo de la invención que compite por la unión a IL-17 humana con un anticuerpo competidor que comprende secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N°: 241 y 118 está caracterizado además por tener una  $K_D$  para IL-17 humana inferior a aproximadamente 7 pM, 6,5 pM o 6 pM, preferentemente inferior a aproximadamente 5,5 pM, 5 pM o 4,5 pM y del modo más preferente inferior a aproximadamente 4 pM y/o está caracterizada por una  $CI_{50}$ , preferentemente en un ensayo indicador de IL-8 *in vitro*, que es inferior a 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM o 500 pM, o por una  $CI_{50}$  en un ensayo indicador de GRO $\alpha$  *in vitro* inferior a 560 pM, y/o tiene una constante de disociación ( $k_{off}$ ) para IL-17 humana inferior a  $5 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  o  $2 \times 10^{-5} s^{-1}$ .

En una realización, un anticuerpo anti-IL-17 de la invención tiene una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena pesada comprende regiones CDR con las secuencias de aminoácidos siguientes: CDRH1 (SEC ID N°: 244), CDRH2 (SEC ID N°: 245) y CDRH3 (SEC ID N°: 246); y/o en el que la región variable de cadena ligera comprende regiones CDR con las secuencias de aminoácidos siguientes: CDRL1 (SEC ID N°: 247), CDRL2 (SEC ID N°: 248) y CDRL3 (SEC ID N°: 249). Preferentemente, las seis CDR de un anticuerpo de la invención existen juntas como en un Fab enumerado en la tabla 1 del presente documento. Incluso más preferentemente, las CDR de cadena pesada están en el contexto de las secuencias estructurales siguientes: FR1 con SEC ID N°: 262, FR2 con SEC ID N°: 263, FR3 con SEC ID N°: 264 y FR4 con SEC ID N°: 265 y las CDR de cadena ligera están en el contexto de las secuencias estructurales siguientes: FR1 con SEC ID N°: 266, FR2 con SEC ID N°: 267, FR3 con SEC ID N°: 268 y FR4 con SEC ID N°: 269, siendo el orden partiendo del extremo amino terminal FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Se contempla también que un anticuerpo anti-IL-17 de la invención comprenda una HCVR que comprende una CDRH1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 11-28 y/o una CDRH2

que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 29-32 y/o una CDRH2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 33-55 y 261. Se contempla también que un anticuerpo anti-IL-17 de la invención comprenda una LCVR que comprende una CDRL1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 122-149 y/o una CDRL2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 150-167, y/o una CDRL3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consta SEC ID N°: 168-177. En una realización preferente, un anticuerpo anti-IL-17 de la invención comprende una HCVR que comprende una CDRH1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 11-28 y/o una CDRH2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 29-32 y/o una CDRH3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 33-55 y 261, y además comprende una LCVR que comprende una CDRL1 con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 122-149 y/o una CDRL2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 150-167 y/o una CDRL3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 168-177.

La composición que comprende una CDR de la invención será generalmente una secuencia de la cadena pesada o ligera del anticuerpo o una porción sustancial del mismo, en el que la CDR está ubicada en una ubicación consistente con la numeración de Kabat. Las tres regiones CDR para cada cadena, pesada y ligera, se proporcionan en una región estructural como secuencia contigua representada por la fórmula siguiente: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. El FR1, FR2, FR3 y FR4 de cadena pesada o ligera se combinan para formar una región estructural de un anticuerpo cuando se disponen como una secuencia contigua con las CDR en el orden indicado. Preferentemente, las regiones estructurales de un anticuerpo de la invención son de origen humano o sustancialmente de origen humano (es decir, con más de aproximadamente el 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97 %).

En un anticuerpo humanizado para uso terapéutico en seres humanos, la secuencia estructural es preferentemente total o sustancialmente de origen humano. Preferentemente, la región estructural de la cadena ligera de un anticuerpo humanizado, humano o quimérico de la invención comprende una FR1 con SEC ID N°: 266, FR2 con SEC ID N°: 267, FR3 con SEC ID N°: 268 y FR4 con SEC ID N°: 269. Preferentemente, la región estructural de cadena pesada de un anticuerpo humanizado, humano o quimérico de la invención comprende FR1 con SEC ID N°: 262, FR2 con SEC ID N°: 263, FR3 con SEC ID N°: 264 y FR4 con SEC ID N°: 265. Por ejemplo, una realización preferente de LCVR del anticuerpo 126 de la invención, tal como se describe en las tablas 1, 2 y 3 del presente documento comprende (polipéptidos ordenados a partir del extremo N terminal) FR1 con SEC ID N°: 266, CDR1 con SEC ID N°: 131, FR2 con SEC ID N°: 267, CDR2 con SEC ID N°: 167, FR3 con SEC ID N°: 268, CDR3 con SEC ID N°: 168 y FR4 con SEC ID N°: 269. La secuencia de LCVR total, unida operativamente a una región constante kappa humana es como se muestra en SEC ID N°: 274. Además, una realización preferente de HCVR del anticuerpo 126 de la invención comprende (ordenados a partir del extremo N terminal) una FR1 con SEC ID N°: 262, CDR1 con SEC ID N°: 26, FR2 con SEC ID N°: 262, CDR2 con SEC ID N°: 30, FR3 con SEC ID N°: 264, CDR3 con SEC ID N°: 52 y FR4 con SEC ID N°: 265. La secuencia de la HCVR total, unida operativamente a una región Fc de IgG<sub>4</sub> humana es como se muestra en SEC ID N°: 273.

En una realización, un anticuerpo anti-IL-17 de la invención, en el que la totalidad o una porción de la región variable está limitada por una secuencia particular tal como se muestra en SEC ID N° en el presente documento (véase, por ejemplo, las tablas 1-3) está caracterizado también por ser un anticuerpo quimérico, humanizado o totalmente humano o una porción de unión al antígeno del mismo que antagoniza o neutraliza al menos la actividad de una IL-17 humana *in vivo* o *in vitro*. Un anticuerpo IL-17 de la invención, en el que la totalidad o una porción de la región variable está limitada por una secuencia particular tal como se muestra en SEC ID N° en el presente documento está caracterizada porque se une a IL-17 humana pero no se une a IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F humana. Adicionalmente, el anticuerpo se caracteriza además por unirse específicamente a IL-17 humana e IL-17 de mono cynomolgus, pero no se une a IL-17 de rata o IL17 de ratón a niveles superiores al nivel de fondo.

Más preferentemente, dicho anticuerpo está caracterizado además porque se une a un epítipo no lineal de IL-1 humana que comprende los aminoácidos DGNVDYH (SEC ID N°: 276), en la que el anticuerpo entra en contacto con el polipéptido con SEC ID N°: 276. Incluso más preferentemente, dicho anticuerpo está caracterizado además por tener una K<sub>D</sub> para IL-17 humana inferior a aproximadamente 7 pM, 6,5 pM o 6 pM, preferentemente inferior a aproximadamente 5,5 pM, 5 pM o 4,5 pM y del modo más preferente inferior a aproximadamente 4 pM y/o está caracterizado por una CI<sub>50</sub>, preferentemente en un ensayo indicador de IL-8 *in vitro*, que es inferior a 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM o 500 pM, o por una CI<sub>50</sub> en un ensayo indicador de GRO $\alpha$  *in vitro* inferior a 560 pM, y/o tiene una constante de disociación (K<sub>off</sub>) para IL-17 humana inferior a 5 x 10<sup>-5</sup>, 4 x 10<sup>-5</sup>, 3 x 10<sup>-5</sup> o 2 x 10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup>.

#### Expresión de anticuerpos

La presente invención también se refiere a líneas celulares que expresan un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención o una porción del mismo. La creación y aislamiento de líneas celulares que producen un anticuerpo monoclonal de la invención puede realizarse usando técnicas estándar conocidas en la técnica. Las líneas celulares preferentes incluyen COS, CHO, SP2/0, NS0 y levadura (disponibles de depósitos públicos tales como ATCC, Colección estadounidense de cultivos tipo, Manassas, VA).

Puede usarse una amplia diversidad de sistemas de expresión de huéspedes para expresar un anticuerpo de la presente invención, incluidos sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos (tales como levaduras, baculovirus, células vegetales, de mamíferos y otras células animales, animales transgénicos y células de hibridoma), así como sistemas de expresión de presentación en fagos. Un ejemplo de un vector de expresión bacteriano adecuado es pUC119 y un vector de expresión eucariótico adecuado es un vector pcDNA3.1 modificado con un sistema de selección *dhfr* debilitado. También se conocen en la técnica otros sistemas de expresión de anticuerpo y se contemplan en el presente documento.

Un anticuerpo de la invención puede prepararse mediante expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulinas en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo recombinantemente, una célula huésped se transforma, se transduce, se infecta o similar con uno o varios vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y/o pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de modo que las cadenas ligera y/o pesada se expresen en la célula huésped. La cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse independientemente de promotores diferentes a los que están unidas operativamente en un vector o, alternativamente, la cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse independientemente de diferentes promotores a los que están unidas operativamente en dos vectores: uno que expresa la cadena pesada y uno que expresa la cadena ligera. Opcionalmente, la cadena pesada y la cadena ligera pueden expresarse en distintas células huésped. Preferentemente, los anticuerpos recombinantes se segregan en el medio en el que se cultivan las células huésped a partir de las cuales se van a recuperar o purificar los anticuerpos. Se usan metodologías de ADN recombinante estándar para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células huésped. Dichas tecnologías de ADN recombinante estándar se describen, por ejemplo, por Sambrook, Fritsch y Maniatis (ediciones), en *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel y col. (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1989.

Un ADN aislado que codifica una región HCVR puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniéndose operativamente al ADN que codifica la HCVR a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de regiones constantes de cadena pesada humanos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos, publicación NIH N° 91-3242 (1991). Pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones, por ejemplo, mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgM o IgD), clase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> y IgG<sub>4</sub>) o subclase de región constante y cualquier variante alotípica de las mismas tal como se describe en Kabat (referencia anterior). Alternativamente, la porción de unión a antígeno puede ser un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, Fd o un fragmento Fv monocatenario (FVmc). Para un gen de cadena pesada de un fragmento Fab, el ADN que codifica la HCVR puede estar operativamente unido a otra molécula de ADN que codifica una región constante CH1 de cadena pesada.

Un ADN aislado que codifica una región LCVR puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como en un gen de cadena ligera de Fab) uniéndose operativamente el ADN que codifica la LCVR a otra molécula de ADN que codifica una región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kabat, referencia anterior. Pueden obtenerse fragmentos de ADN que abarcan estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen FVmc, los fragmentos de ADN que codifican la HCVR y la LCVR se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de modo que las secuencias HCVR y LCVR puedan expresarse en forma de proteína monocatenaria contigua, con las regiones LCVR y HCVR unidas con un enlazador flexible. Véase, por ejemplo, Bird y col., *Science* 242:423-6, 1988; Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83, 1988; McCafferty y col., *Nature* 348:552-4, 1990.

En una realización, la invención proporciona un vector, preferentemente (pero sin estar limitado a) un plásmido, un vector de expresión recombinante, un vector de expresión de levadura o un vector de expresión retroviral que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención. Alternativamente, un vector de la invención comprende un polinucleótido que codifica una LCVR y/o un polinucleótido que codifica una HCVR de la invención. Cuando una secuencia que codifica tanto una LCVR como una HCVR está presente en el mismo vector, pueden transcribirse independientemente, cada una a partir de un promotor aparte al que está unida operativamente. Si las secuencias que codifican la LCVR y la HCVR están presentes en el mismo vector y se transcriben a partir de un promotor al que están unidas operativamente, la LCVR puede estar en la posición 5' con respecto a la HCVR o la LCVR puede estar en la posición 3' con respecto a la HCVR; además, la LCVR y la HCVR que codifican la región en el vector pueden estar separadas por una secuencia enlazadora de cualquier tamaño o contenido, siendo preferentemente dicho enlazador, si está presente, un polinucleótido que codifica un sitio de entrada de ribosoma interna.

Para expresar un anticuerpo de la invención, se inserta un ADN que codifica una cadena ligera y/o pesada parcial o de longitud completa, obtenido tal como se ha describe anteriormente, en un vector de expresión de modo que el gen esté unido operativamente a secuencias control transcripcionales y traduccionales. El vector de expresión y las

secuencias de control de la expresión se eligen para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión usando procedimientos estándar. Adicionalmente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilite la secreción de la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal anti-IL-17 a partir de una célula huésped. El gen de la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo monoclonal anti-IL-17 puede clonarse en un vector de modo que el péptido de señal quede unido operativamente en fase al extremo amino terminal del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo.

Además del gen o los genes de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo, un vector de expresión recombinante de la invención porta secuencias reguladoras que controlan la expresión del gen o los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" se pretende que incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación), tal como sea necesario, que controlen la transcripción o traducción del gen o los genes de la cadena del anticuerpo. El diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado. Las secuencias reguladoras preferentes para la expresión de células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que se dirigen a niveles altos de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus de simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y virus de polioma.

Además de los genes de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y uno o varios genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector. Por ejemplo, típicamente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferentes incluyen el gen dihidrofolato reductasa (*dhfr*) (para su uso en células huésped *dhfr*-menos con selección/amplificación de metotrexato), el gen *neo* (para selección de G418) y glutamina sintasa (GS) en una línea celular GS negativa (tal como NS0) para selección/amplificación.

Para la expresión de las cadenas ligera y/o pesada, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y/o ligera se introducen en una célula huésped usando técnicas estándar, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección de DEAE-dextrano, transducción, infección y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células procarióticas o eucarióticas, son preferentes células eucarióticas, y las más preferentes las células huésped de mamífero, debido a que es más probable que dichas células se ensamblen y segreguen un anticuerpo plegado apropiadamente e inmunológicamente activo. Las células huésped de mamífero preferentes para expresar anticuerpo recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) [que incluyen células CHO *dhfr* menos, descritas en Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20, 1980, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, tal como se describe por Kaufman y Sharp, en J. Mol. Biol. 159:601-21, 1982] células de mieloma NS0, células COS y células SP2/0. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped en condiciones apropiadas conocidas en la técnica. Los anticuerpos pueden recuperarse a partir de la célula huésped y/o el medio de cultivo usando procedimientos de purificación estándar.

También pueden usarse células huésped para producir porciones, o fragmentos, de anticuerpos intactos, por ejemplo, fragmentos Fab o moléculas FVmc usando técnicas que son convencionales. Se entenderá por parte de un experto que las variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifique bien la cadena ligera o bien la cadena pesada de un anticuerpo de la invención. También puede usarse tecnología de ADN recombinante para eliminar parte o todo el ADN que codifica bien ambas o bien una de las cadenas ligera y pesada que no es necesario para unirse a la IL-17. Las moléculas expresadas a partir de dicho ADN truncado también están abarcadas por los anticuerpos de la invención.

La invención proporciona una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Preferentemente, una célula huésped de la invención comprende uno o varios vectores o constructos que comprenden una molécula de ácido nucleico de la presente invención. La célula huésped de la invención es una célula en la que se ha introducido un vector de la invención, comprendiendo dicho vector un polinucleótido que codifica una LCVR de un anticuerpo de la invención y/o un polinucleótido que codifica una HCVR de la invención. La invención también proporciona una célula huésped en la que se han introducido dos vectores de la invención, uno que comprende un polinucleótido que codifica una LCVR de un anticuerpo de la invención y uno que comprende un polinucleótido que codifica una HCVR presente en un anticuerpo de la invención y cada uno se ha unido operativamente a una secuencia promotora. Los tipos de célula huésped incluyen células de mamífero, bacterianas,

vegetales y de levadura. Preferentemente, la célula huésped es una célula CHO, una célula COS, una célula SP2/0, una célula NS0, una célula de levadura o un derivado o progenie de cualquier tipo de células preferente.

En un sistema preferente para la expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO *dhfr*-menos mediante, por ejemplo transfección mediada con fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno unidos operativamente a elementos reguladores de potenciador/promotor (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tales como un elemento regulador potenciador CMV/promotor AdMLP o un elemento regulador potenciador SV40/promotor AdMLP) para conducir niveles altos de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen *dhfr* que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera a partir del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huéspedes, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo a partir del medio de cultivo. Los anticuerpos, o porciones de unión al antígeno de los mismos, de la invención pueden expresarse en un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor y col., Nucleic Acids Res. 20:6287-95, 1992).

Una vez expresados, los anticuerpos intactos, sus dímeros, cadenas ligera y pesada individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden purificarse según procedimientos estándar de la técnica, incluidos precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de intercambio iónico, afinidad, fase inversa, interacción hidrófoba, electroforesis en gel y similares. Son preferentes las inmunoglobulinas sustancialmente puras con al menos aproximadamente el 90 %, 92 %, 94 % o 96 % de homogeneidad y las más preferentes con del 98 al 99 % o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o a homogeneidad según se desee, los péptidos pueden usarse después terapéutica o profilácticamente, tal como se dirige en el presente documento.

#### Anticuerpo quimérico

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo quimérico" incluye inmunoglobulinas divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero formado por una cadena pesada quimérica asociada por medio de puentes disulfuro con una cadena ligera quimérica. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero formado por dos dímeros de cadena pesada-cadena ligera asociados por medio de al menos un puente disulfuro.

Una cadena pesada quimérica de un anticuerpo comprende una región de unión al antígeno derivada de la cadena pesada de un anticuerpo no humano específico para IL-17, que está unido operativamente a al menos una porción de una región constante de cadena pesada humana, o sustancialmente humana (o especie diferente de esa de la que se derivó la región de unión al antígeno), tales como CH1 o CH2, o preferentemente a una región constante de cadena pesada de longitud completa. Una cadena ligera quimérica de un anticuerpo para su uso en seres humanos comprende una región de unión al antígeno derivada total o sustancialmente a partir de la cadena ligera o de un anticuerpo no humano específica de IL-17, unida operativamente a al menos una porción de una región constante de cadena ligera humana, o sustancialmente humana (o especie diferente de esa de la que se derivó la región de unión al antígeno), (CL), o preferentemente a una región constante de cadena ligera. Los anticuerpos, fragmentos o derivados que tienen cadenas pesadas quiméricas y cadenas ligeras de la misma o diferente especificidad de unión a la región variable, también pueden prepararse asociando apropiadamente cadenas de polipéptidos individuales según etapas de procedimientos conocidos.

Con este enfoque, los huéspedes que expresan cadenas pesadas quiméricas se cultivan aparte de los huéspedes que expresan cadenas ligeras quiméricas, y las cadenas de inmunoglobulinas se recuperan por separado y después se asocian. Alternativamente, los huéspedes pueden cultivarse conjuntamente y se permite que las cadenas se asocien espontáneamente en el medio de cultivo, seguido por la recuperación de la inmunoglobulina o fragmento ensamblado. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos N<sup>o</sup>: 6.284.471; 5.807.715; 4.816.567 y 4.816.397).

#### Anticuerpos humanizados

Preferentemente, un anticuerpo de la invención para su uso para fines terapéuticos tendría la secuencia de la región estructural y de la región constante (en la medida que exista en el anticuerpo) derivada del mamífero en el que se va a usar como producto terapéutico con el fin de reducir la posibilidad de que el mamífero desencadene una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo terapéutico. Los anticuerpos humanizados son de interés particular ya que se considera que son valiosos para su aplicación terapéutica y evitan la respuesta al anticuerpo anti-ratón humano observada frecuentemente con anticuerpos de roedores. Adicionalmente, en anticuerpos humanizados, la porción efectora del anticuerpo es de origen humano de modo que pueda interactuar mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano (por ejemplo, destruir las células diana más eficazmente mediante citotoxicidad dependiente del complemento o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. Además, los anticuerpos humanizados inyectados

pueden tener una semivida más parecida a la de los anticuerpos humanos de origen natural que, por ejemplo, anticuerpos murinos, permitiendo de este modo la administración de dosis pequeñas y menos frecuentes. La expresión "anticuerpo humanizado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que comprende porciones de anticuerpos de origen diferente, en el que al menos una porción es de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones derivadas de un anticuerpo de origen no humano con la especificidad requerida, tal como un ratón, y de un anticuerpo de origen humano, unidos conjuntamente químicamente mediante técnicas convencionales (por ejemplo, sintéticas) o preparadas en forma de un polipéptido contiguo usando técnicas de ingeniería genética.

Preferentemente, un "anticuerpo humanizado" tiene CDR originadas (o sustancialmente originadas) a partir de un anticuerpo no humano (preferentemente un anticuerpo monoclonal de ratón), mientras que el marco estructural y la región constante, en la medida en que esté presente, (o una porción significativa o sustancial de la misma, es decir, al menos aproximadamente el 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), están codificados por la información de secuencias de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, la base de datos internacional InternationallmMunoGeneTicsDatabase) o en formas recombinadas o mutadas de los mismos tanto si se producen dichos anticuerpos en células humanas o como si no.

Las CDR de un anticuerpo humanizado pueden alterarse u optimizarse a partir de las CDR de un anticuerpo parental no humano que originaron para generar propiedades deseadas, por ejemplo, especificidad, afinidad y/o unión preferencial. Las CDR alteradas u optimizadas pueden tener sustituciones de aminoácidos, adiciones y/o deleciones en comparación con unas CDR parentales, preferentemente aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 en total entre los seis dominios de CDR. Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos de las CDR que están subrayadas y en negrita en las tablas 2 y 3 son posiciones que se han alterado a partir de las CDR tal como se muestran en Fab 1 de las tablas 2 y 3. Alternativamente, el anticuerpo 2321 murino puede ser un anticuerpo parental para la comparación de las CDR de un anticuerpo de la invención.

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) incluyen un anticuerpo intacto, un anticuerpo sustancialmente intacto, una porción de un anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno, o una porción de un anticuerpo que comprende un fragmento Fab, un fragmento Fab', F(ab')<sub>2</sub>, o un fragmento Fv monocatenario. Los anticuerpos humanizados contienen preferentemente secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o estructurales. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los al menos uno y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los aminoácidos de las regiones CDR corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los aminoácidos de las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprende, óptimamente, al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. [Jones y col., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).]

Los anticuerpos humanizados pueden someterse a mutagénesis *in vitro* usando procedimientos de uso rutinario en la técnica (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, así, las secuencias de aminoácidos estructurales de las regiones HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes humanizados son secuencias que, aunque derivadas de las relacionadas con secuencias de HCVR y LCVR de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural en el repertorio de líneas germinales de anticuerpos humanos *in vivo*. Se contempla que dichas secuencias de aminoácidos de las regiones estructurales de HCVR y LCVR de los anticuerpos recombinantes humanizados son al menos el 90 %, 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 98 % o del modo más preferente al menos el 99 % idénticas a una secuencia de línea germinal humana. Preferentemente, esos restos estructurales del anticuerpo parental (por ejemplo, anticuerpo murino o generalmente el anticuerpo del que se deriva el anticuerpo humanizado) que conservan o afectan a estructuras de sitio de combinación, se mantendrán. Estos restos pueden identificarse, por ejemplo, usando cristalografía de rayos X del anticuerpo parental o fragmento Fab, identificando de este modo la estructura tridimensional del sitio de unión al antígeno. Una estrategia para humanizar anticuerpos es elegir una secuencia de línea germinal humana con la mayor homología con el marco estructural del anticuerpo parental como el marco estructural que recibe las CDR donantes. Este enfoque de línea germinal se basa en el mismo fundamento que la estrategia más adecuada, pero sólo se buscan secuencias de líneas germinales en las bases de datos.

El anticuerpo humanizado de la presente invención puede comprender o derivarse de un marco estructural de cadena ligera de línea germinal humana. En realizaciones particulares, la secuencia de línea germinal de cadena ligera se selecciona de secuencias de VK humanas que incluyen, pero no están limitadas a, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 y O8. en determinadas realizaciones, este marco estructural de línea germinal humana de cadena ligera I se selecciona entre V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4 y V5-6.

En otras realizaciones, el anticuerpo humanizado de la presente invención puede comprender, o derivarse de, un marco estructural de cadena pesada de línea germinal humana. En realizaciones particulares, este marco estructural de línea germinal humana de cadena pesada se selecciona entre VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1 y VH7-81. Véase el documento PCT WO 2005/005604 para una descripción de las distintas secuencias de línea germinal.

En realizaciones particulares, la región variable de cadena ligera y/o la región variable de cadena pesada comprenden una región estructural o al menos una porción de una región estructural (que, por ejemplo, contiene 2 ó 3 subregiones, tales como FR2 y FR3). En determinadas realizaciones, al menos FRL1, FRL2, FRL3 o FRL4 es totalmente humana. En otras realizaciones, al menos FRH1, FRH2, FRH3 o FRH4 es totalmente humana. En algunas realizaciones, al menos FRL1, FRL2, FRL3 o FRL4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana) o comprende secuencias consenso humanas para el marco estructural particular. En algunas realizaciones, al menos FRH1, FRH2, FRH3 o FRH4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana) o comprende secuencias consenso humanas para el marco estructural particular. En realizaciones preferentes, la totalidad de la región estructural es una región estructural humana.

En general, pueden producirse anticuerpos humanizados obteniendo secuencias de ácidos nucleicos que codifican la HCVR y la LCVR de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo murino o un anticuerpo fabricado mediante hibridoma, que se une al epítotope IL-17 de la invención, que identifica las CDR en dichas HCVR y LCVR (no humanas), e injerta dichas secuencias de ácidos nucleicos que codifican CDR en secuencias de ácidos nucleicos que codifican el marco estructural humano seleccionadas. Opcionalmente, una región CDR puede optimizarse mutagenizando aleatoriamente o en ubicaciones particulares con el fin de sustituir uno o varios aminoácidos de la CDR por un aminoácido diferente antes de injertar la región DCR en la región estructural. Alternativamente, una región CDR puede optimizarse subsiguientemente a la inserción en la región estructural humana usando procedimientos disponibles para un experto en la técnica. Preferentemente, las secuencias de aminoácidos estructurales humanas se seleccionan de modo que sea probable que el anticuerpo resultante sea adecuado para la administración *in vivo* en seres humanos. Esto puede determinarse, por ejemplo, sobre la base del uso previo de anticuerpos que contienen dicha secuencia estructural humana. Preferentemente, la secuencia estructural humana no será por sí misma significativamente inmunogénica.

Alternativamente, las secuencias de aminoácidos de los marcos estructurales de los anticuerpos que se van a humanizar pueden compararse con las secuencias de marcos estructurales humanos conocidos, las secuencias de marcos estructurales humanos que se van a usar para el injerto de CDR, y se seleccionan sobre la base de las secuencias comprendidas que son muy similares a las del anticuerpo parental, por ejemplo, un anticuerpo murino que se une a IL-17 (por ejemplo, un anticuerpo que comprende una HCVR con SEC ID N°: 270 y que además comprende una LCVR con SEC ID N°: 271). Se han aislado numerosas secuencias estructurales humanas y se ha informado de sus secuencias en la técnica. Esto mejora la probabilidad de que el anticuerpo humanizado injertado a CDR resultante, que contiene CDR del anticuerpo parental (por ejemplo, murino) o CDR optimizadas del anticuerpo parental injertado a marcos estructurales humanos seleccionados (y posiblemente también la región constante humana) mantendrán sustancialmente la estructura de unión al antígeno y, de este modo, mantendrán la afinidad de unión del anticuerpo parental. Para mantener un grado significativo de afinidad de unión a antígeno, las regiones estructurales humanas seleccionadas serán preferentemente las que se espera que sean adecuadas para la administración *in vivo*, es decir, no inmunogénicas.

En ambos procedimientos, se obtiene la secuencia de ADN que codifica las regiones HCVR y LCVR del anticuerpo anti-IL-17 preferentemente murino. Los procedimientos para clonar secuencias de ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas son conocidas en la técnica. Dichos procedimientos pueden, por ejemplo, implicar la amplificación de las secuencias que codifican inmunoglobulina que se van a clonar usando cebadores apropiados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se ha informado de cebadores adecuados para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos de inmunoglobulina y específicamente las secuencias de HCVR y LCVR murinas en la bibliografía. Después de que dichas secuencias que codifican inmunoglobulina se hayan clonado, serán secuencias mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Después de que las secuencias que codifican CDR se injerten en las secuencias que codifican marcos estructurales humanos seleccionadas, las secuencias de ADN resultantes que codifican las secuencias pesada variable y ligera variable "humanizadas" se expresan después para producir un Fv humanizado o un anticuerpo humanizado que se une a IL-17. La HCVR y la LCVR humanizadas pueden expresarse como parte de una molécula de anticuerpo anti-IL-17 completa, es decir, como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humano cuyas secuencias de ADN codificante se han obtenido de bibliotecas disponibles comercialmente o que se han obtenido usando, por ejemplo, uno de los procedimientos descritos anteriormente para obtener secuencias de ADN, o que existen en la técnica. No obstante, las secuencias de HCVR y LCVR también pueden expresarse en ausencia de secuencias constantes para producir un Fv anti-IL-17 humanizado. De todas las maneras, la fusión de secuencias constantes humanas con la región variable es potencialmente deseable, debido a que al anticuerpo anti-IL-17 humanizado resultante puede poseer funciones efectoras humanas.

Los procedimientos para sintetizar ADN que codifica una proteína de secuencia conocida son bien conocidos en la técnica. Usando dichos procedimientos, se sintetizan secuencias de ADN que codifican las secuencias de HCVR y LCVR humanizadas objeto (con o sin regiones constantes), y después se expresan en un sistema vector adecuado para la expresión de anticuerpos recombinantes. Esto puede efectuarse en cualquier sistema vector que proporcione secuencias de HCVR y LCVR humanizadas objeto que se expresen como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humano y se asocien para producir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos funcionales (de unión al antígeno).

Las secuencias de dominios constantes humanos son conocidas en la técnica y se ha informado de las mismas en la bibliografía. Las secuencias de cadena ligera constante humana preferentes incluyen las secuencias de cadena ligera constante kappa y lambda. Las secuencias de cadena pesada constante humana preferentes incluyen IgG<sub>1</sub> humana, IgG<sub>2</sub> humana, IgG<sub>3</sub> humana, IgG<sub>4</sub> humana (véase, por ejemplo, SEC ID N°: 257-260 respectivamente) y versiones mutadas de las mismas que proporcionan una función efectora alterada, por ejemplo, una semivida *in vivo* potenciada, una unión al receptor reducida y un perfil de desaminación alterado y similares.

Si están presentes, las regiones estructurales humanas se derivan preferentemente de una región variable del anticuerpo humano que tenga similitud de secuencia con la región análoga o equivalente del donante de la región de unión al antígeno (es decir, el anticuerpo parental). Otras fuentes de regiones estructurales para porciones de origen humano de un anticuerpo humanizado incluyen secuencias consenso variables humanas (véase, por ejemplo, Kettleborough, C.A. y col. Protein Engineering 4:773-783 (1991); Carter y col., el documento WO 94/04679. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo o región variable usada para obtener la porción no humana puede compararse con las secuencias humanas tal como se describen por Kabat y col. Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, NIH, Oficina de Impresión del Gobierno de Estados Unidos (1991). En una realización particularmente preferente, las regiones estructurales de una cadena de anticuerpo humanizado se derivan de una región variable humana que tiene al menos aproximadamente el 60 % de identidad de secuencia total, preferentemente al menos aproximadamente el 70 %, 80 %, o 90 % de identidad de secuencia total y más preferentemente al menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia total, con la región variable de un donante no humano. Una porción humana también puede derivarse de un anticuerpo humano que tenga al menos aproximadamente el 65 % de identidad de secuencia, y preferentemente al menos aproximadamente el 70 % de identidad de secuencia, dentro de una porción particular (por ejemplo, FR) que está usándose, en comparación con la porción equivalente (por ejemplo, FR) del donante no humano.

Las referencias que describen también procedimientos implicados en la humanización de anticuerpo de ratón que pueden usarse son, por ejemplo, Queen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2869, 1991; documento de patente de Estados Unidos N° 5.693.761; documento de patente de Estados Unidos N° 4.816.397; documento de patente de Estados Unidos N° 5.225.539; programas informáticos ABMOD y ENCAD tal como se describen por Levitt, M., J. Mol. Biol. 168:595-620, 1983; la humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature, 321: 522-525, 1986; Riechmann y col., Nature, 332:323-327, 1988; Verhoeyen y col., Science, 239:1534-1536, 1988).

#### Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluidas bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381, 1991; Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581, 1991). Las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, páginas. 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol., 147:86-95, 1991). De forma similar, pueden fabricarse anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Después de la inmunización, por ejemplo con un antígeno que comprende un epítopo inmunogénico de la invención, se obtiene un repertorio completo de producción de anticuerpo humano, que se parece mucho al visto en seres humanos en todos los aspectos, incluidos reordenamiento de genes, ensamble y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.589.369; 5.591.669; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., BioTechnology 10:779-783, 1992; Lonberg y col., Nature 368: 856-859, 1994; Morrison, Nature 368: 812-13, 1994; Fishwild y col., Nature Biotechnology 14:845-51, 1996; Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995) y Jobkobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551, 1993.

También se describen genes de inmunoglobulina humana introducidos en el ratón, creando de este modo ratones transgénicos capaces de responder a antígenos con anticuerpos que tienen secuencias humanas por Bruggemann y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6709-6713, 1989). Hay varias estrategias que existen para la generación de mamíferos que producen anticuerpos humanos. En particular, existe el enfoque de "minilocus" en el que se imita un locus de Ig exógeno mediante la inclusión de piezas (es decir, genes individuales) a partir del locus de Ig (véase, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos N° 5.545.807, 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650 y 5.814.318, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215), introducción de YAC de grandes y sustancialmente fragmentos de línea germinal de los locus de Ig (Véase Mendez y col. Nature Genetics 15:146-156,

1997; Green y Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495, 1998), e introducción de locus completos o sustancialmente completos mediante el uso de fusión de microcélulas (véase la solicitud de patente europea EP 0 843 961 A1).

5 Cualquier ratón transgénico capaz de responder a la inmunización con anticuerpos que tenga secuencias humanas puede usarse para producir un anticuerpo anti-IL-17 de la invención cuando se usan procedimientos disponibles para un experto en la técnica, por ejemplo, cuando dicho ratón se inmuniza con un polipéptido que comprende un epítoto inmunogénico de la invención.

#### Usos

10 Los anticuerpos de la presente invención son útiles en aplicaciones terapéuticas, profilácticas, de diagnóstico y de investigación. Un anticuerpo de la invención puede usarse para diagnosticar un trastorno o enfermedad asociado con la expresión de IL-17 humano. De un modo similar, el anticuerpo de la invención puede usarse en un ensayo para realizar un seguimiento de los niveles de IL-17 en un sujeto que está siendo analizado para determinar la afección asociada a IL-17. Las aplicaciones de investigación incluyen procedimientos que usan el anticuerpo de la invención y un marcador para detectar IL-17 en una muestra, por ejemplo en un fluido corporal humano o en una célula o extracto de tejido. Los anticuerpos de la invención pueden usarse con o sin modificación, y se marcan mediante la unión covalente o no covalente de un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que sea capaz de producir, bien directa o bien indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo tal como, por ejemplo,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^{125}\text{I}$ , un compuesto fluorescente o quimioluminescente tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina, o una enzima tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar por separado el anticuerpo al resto detectable, incluidos los procedimientos descritos por Hunter y col., Nature 144:945, 1962; David y col., Biochemistry 13: 1014, 1974; Pain y col., J. Immunol. Meth. 40: 219, 1981; y Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30: 407, 1982.

25 Se conocen en la técnica una diversidad de protocolos para medir IL-17, incluidos, por ejemplo, ELISA, RIA y FACS, y proporcionan una base para diagnosticar niveles alterados o anormales de expresión de IL-17. Los valores de expresión normales o estándar se establecen usando cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo combinando una muestra que comprende un polipéptido IL-17 con, por ejemplo, anticuerpos en condiciones adecuadas para formar un complejo antígeno:anticuerpo. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversos enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de un material radioactivo incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ . (Véase, por ejemplo, Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987)). La cantidad de un complejo estándar formada se cuantifica usando diversos procedimientos, tales como, por ejemplo medios fotométricas. Las cantidades de polipéptido IL-17 expresado en muestras se compara después con los valores estándar.

40 Por razones de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención puede proporcionarse en un kit, un envase con una combinación de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo se etiqueta con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores que requiere la enzima (por ejemplo, un sustrato precursor que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos puede variarse de forma amplia para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos pueden proporcionarse en forma de polvos secos, generalmente liofilizados, que incluyen excipientes que proporcionarán en disolución una solución del reactivo que tenga la concentración apropiada.

#### Usos terapéuticos del anticuerpo

50 La IL-17 es una citocina proinflamatoria segregada por linfocitos T activados en los sitios de la inflamación, no en la circulación sistémica; no es fácilmente detectable en el suero o tejidos de una persona sana. La IL-17 regula al alza moléculas de adhesión, induce la producción de múltiples citocinas y quimiocinas inflamatorias de diversos tipos de células incluidas sinoviocitos, condrocitos, fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, induciendo de este modo el reclutamiento de neutrófilos en un sitio inflamatorio, estimula la producción de prostaglandinas y metaloproteinasas, e inhibe la síntesis de proteoglicano. Además, la IL-17 tiene un papel importante en la maduración de células progenitoras hematopoyéticas. La IL-17 tiene papeles señalizadores en diferentes órganos y tejidos que incluyen pulmón, cartílago articular, hueso, cerebro, células hematopoyéticas, riñón, piel e intestino. La IL-17 comparte el 15-27 % de homología de aminoácidos con las IL-17 B, C y E y el 44-50 % de homología de aminoácidos con las IL-17 D y F. La IL-17 se une al receptor de IL-17 con afinidad baja (aproximadamente 1 nM), mientras que otros miembros de la familia de las IL-17 no se unen al receptor de IL-17.

Los niveles aumentados de IL-17 (es decir, IL-17A) se han asociado con varias afecciones que incluyen inflamación de las vías aéreas, AR, osteoartritis, erosión ósea, abscesos y adhesiones intraperitoneales, IBD, rechazo de aloinjerto, psoriasis, determinados tipos de cáncer, angiogénesis, aterosclerosis y EM. Tanto IL-17 como IL-17R están reguladas al alza en el tejido sinovial de pacientes con AR. La IL-17 ejerce un papel en la patogénesis de AR mediante rutas dependientes e independientes de IL-1- $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La IL-17 estimula la secreción de otras citocinas y quimiocinas, por ejemplo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y Gro- $\alpha$ . La IL-17 contribuye directamente a la progresión de la enfermedad en AR. La inyección de IL-17 en la rodilla del ratón promueve la destrucción de la articulación independientemente de la actividad de IL-1 $\alpha$  (Ann. Rheum. Dis. 59:529-32, 2000). El anticuerpo anti-IL-1 $\beta$  no tiene ningún efecto sobre la inflamación inducida por IL-17 y la lesión de la articulación (J. Immunol. 167:1004-1013, 2001). En un modelo de artritis murino inducido por SCW, la IL-17 indujo la infiltración de célula inflamatoria y la reducción de proteoglicano en el tipo silvestre y desactiva la IL-1 $\beta$  y desactiva la TNF- $\alpha$  en ratones. Los ratones con IL-17 desactivada son fenotípicamente normales en ausencia de cambios antigénicos, pero tienen artritis marcadamente reducida siguiendo la inmunización con colágeno de tipo II (J. Immunol. 171:6173-6177,2003).

La esclerosis múltiple ("EM") es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por inflamación en el sistema nervioso central ("SNC") con lesión de axones que rodean la capa de mielina. Una característica de la EM es que los linfocitos T se infiltran en el SNC. La EM afecta a más de 350.000 personas en Estados Unidos y a 2,5 millones en todo el mundo. Hay muchas formas y la más común es la recaída/remisión de la enfermedad ("RREM") seguida por una etapa progresiva secundaria. Los productos terapéuticos actuales constan de Interferón- $\beta$  (AVONEX, BETASERON y REBIF) que reduce la tasa de recaída/exacerbación en el 31 %-34 %, pero puede producir síntomas similares a la gripe y/o síntesis de anticuerpos neutralizadores (por ejemplo, aproximadamente el 15 % de pacientes que reciben AVONEX producen anticuerpos neutralizadores en 18 meses. TYSABRI, aprobado por la FDA para RREM se retiró subsiguientemente del mercado debido a asuntos de inmunosupresión del SNC. Existe aún una necesidad médica no satisfecha en el tratamiento de EM. El ARNm de IL-17 se incrementa en lesiones de EM y en células mononucleares (MNC) en sangre en el fluido cerebroespinal de pacientes con EM. Se detectaron niveles más elevados de MNC en sangre que expresan ARNm de IL-17 durante la exacerbación clínica de EM en comparación con la remisión (Multiple Sclerosis, 5:101-104, 1999). Además, la encefalomiélisis autoinmunitaria experimental ("EAE"), un modelo animal preclínico para EM se suprime significativamente en ratones desactivados con IL-17.

Por lo tanto, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la invención puede ser útil para el tratamiento o la prevención de afecciones en las que la presencia de IL-17 provoca, o contribuye a, efectos patológicos no deseados o una disminución de la actividad de IL-17 tiene un beneficio terapéutico en mamíferos, preferentemente seres humanos, incluidos, pero sin estar limitados a, inflamación de las vías aéreas, asma, AR, osteoartritis, erosión ósea, abscesos y adhesiones intraperitoneales, IBD, rechazo de aloinjerto, psoriasis, determinados tipos de cáncer, angiogénesis, aterosclerosis y EM, así como otros trastornos, afecciones, enfermedades o estados inflamatorios incluidos sin ser limitantes: eritematosis, respuesta a exposición alérgica, gastritis asociada a *Helicobacter pylori*, asma bronquial y rechazo de aloinjerto (por ejemplo, renal), eritematosis de lupus sistémico y nefritis de lupus. El uso de un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la presente invención para tratar o prevenir al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente en los que la actividad de IL-17 es perjudicial o que beneficia la disminución de niveles de IL-17 se contempla en el presente documento. Adicionalmente, se contempla el uso de un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la presente invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o los síntomas de los mismos y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", tal como se usa en el presente documento, incluye la administración de un compuesto de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir que la enfermedad tenga lugar en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero todavía no se ha diagnosticado que lo tenga; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o trastorno o aliviar síntomas o complicaciones de la misma. Los regímenes de dosificación puede ajustarse para proporcionar una respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente tal como se indique por las exigencias de la situación terapéutica.

#### Composición farmacéutica

Un anticuerpo de la invención puede incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para su administración al sujeto (véase, por ejemplo, el ejemplo 14). Los compuestos de la invención también pueden administrarse solos o en combinación con un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, tanto en dosis individuales como múltiples. Las composiciones farmacéuticas para administración están diseñadas para que sean apropiadas para el modo de administración seleccionado y se usan según sea apropiado, diluyentes, vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes dispersores, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares (véase, por

ejemplo, el ejemplo 14 del presente documento). Dichas composiciones se diseñan según técnicas convencionales como en, por ejemplo, Remington The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona un compendio de técnicas de formulación que son generalmente conocidas por parte de los profesionales.

- 5 Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 de la presente invención puede administrarse a un sujeto con riesgo de o que exhibe patologías tal como se describen en el presente documento usando técnicas de administración estándar, incluida la administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual o de supositorio.

10 Una composición farmacéutica de la invención es preferentemente una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, ya que se usa una dosis profiláctica en los sujetos antes o en un estado temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

20 Una cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz es al menos la dosis mínima, pero menor que la dosis tóxica, de un agente activo que es necesario para impartir un beneficio terapéutico a un sujeto. Dicho de otro modo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención es una cantidad que reduce la bioactividad de IL-17 en mamíferos, preferentemente seres humanos, por ejemplo uniéndose a IL17R, causando o contribuyendo la presencia de IL-17 a efectos patológicos no deseados o la disminución de los niveles de IL-17 da como resultado un efecto terapéutico beneficioso en un mamífero, preferentemente un ser humano.

25 La vía de administración de un anticuerpo de la presente invención puede ser oral, parenteral, por inhalación o tóxica. Preferentemente, los anticuerpos de la invención pueden incorporarse a una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. La administración sistémica periférica mediante inyección intravenosa o intraperitoneal o subcutánea es preferente. Los vehículos adecuados para dichas inyecciones son sencillos en la técnica.

30 La composición farmacéutica debe ser típicamente estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento en un recipiente proporcionado, incluyendo, por ejemplo, un vial o jeringa sellado. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas pueden filtrarse de forma estéril después de preparar la formulación, o se hacen microbiológicamente aceptables de otro modo. Una composición típica para infusión intravenosa podría tener un volumen de hasta 250-1000 ml de fluido, tal como solución de Ringer estéril, solución salina fisiológica, solución de dextrosa y solución de Hank y una dosis terapéuticamente eficaz (por ejemplo, de 1 a 100 mg/ml, o más) de concentración de anticuerpo. La dosis puede variar dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosificaciones para un sujeto cualquiera dependen de muchos factores, incluidos la altura del paciente, el área superficial corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y de otros fármacos que se van a administrar simultáneamente. Una dosis típica puede encontrarse, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 1000 µg; no obstante, se consideran dosis inferiores o superiores a este ejemplo de intervalo, especialmente considerando los factores mencionados anteriormente. El régimen de dosificación parental diario puede ser de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal total, preferentemente de aproximadamente 0,3 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg y más preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg a 1 mg/kg, incluso más preferentemente de aproximadamente 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal al día. Puede realizarse un seguimiento del progreso mediante evaluaciones periódicas. Para la administración repetida durante varios días o más prolongada, dependiendo de la afección, el tratamiento se repite hasta que tenga lugar una supresión deseada de síntomas de la enfermedad. No obstante, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y no quedan excluidos. La dosificación deseada puede administrarse mediante una administración de bolo única, mediante administraciones de bolos múltiples o mediante administración en infusión continua del anticuerpo, dependiendo de los patrones de decaimiento farmacocinético que el especialista desee lograr.

55 Estas cantidades de anticuerpo sugeridas están sometidas a una gran discreción terapéutica. El factor clave para seleccionar una dosis y una agenda apropiadas es el resultado obtenido. Los factores que se consideran en este contexto incluyen el trastorno particular que se va a tratar, el mamífero particular que se va a tratar, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del anticuerpo, el tipo particular de anticuerpo, el procedimiento de administración, la agenda de administración y otros factores conocidos por el especialista médico.

Los agentes terapéuticos de la invención pueden congelarse o liofilizarse para el almacenamiento y reconstituirse en un vehículo estéril adecuado antes de su uso. La liofilización y la reconstitución pueden causar diversos grados de pérdida de actividad del anticuerpo. Las dosificaciones pueden haberse ajustado con fines de compensación. Generalmente, es preferente un pH entre 6 y 8.

5 Artículo manufacturado

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo manufacturado que contiene materiales útiles para el tratamiento o la prevención de los trastornos o afecciones descritos anteriormente. El artículo manufacturado comprende un recipiente y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botes, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar fabricados de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición de un anticuerpo de la invención que sea eficaz para prevenir o tratar el trastorno o afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un vial con solución intravenosa que tenga un tapón que puede oradarse con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo de la composición es un anticuerpo anti-IL-17 de la invención. La etiqueta de, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de la elección. El artículo manufacturado puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como una solución salina, una solución de Ringer y una solución de dextrosa tamponadas con fosfatos. Puede incluir también otros materiales deseados desde un punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos del envase con instrucciones de uso.

Los siguientes ejemplos de formulación se proporcionan sólo con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ningún modo.

**TABLA 1 SEC ID NÚMEROS**

Fab N°	LCVR	CDR1 ligera	CDR2 ligera	CDR3 ligera	HCVR	CDR1 H	CDR2 H	CDR3 H
1	178	122	150	168	56	11	29	33
2	179	122	150	169	57	11	29	34
3	180	123	150	168	56	11	29	33
4	181	124	150	168	58	11	29	35
5	179	122	150	169	59	11	29	36
6	182	124	150	169	60	11	29	37
7	183	125	150	170	56	11	29	33
8	184	124	150	171	61	11	29	38
9	185	124	150	170	62	11	29	39
10	178	122	150	168	60	11	29	37
11	181	124	150	168	61	11	29	38
12	186	124	150	172	63	11	29	40
13	187	123	150	169	64	11	29	41
14	188	123	150	173	65	11	29	42
15	189	124	150	174	66	11	29	43
16	181	124	150	168	62	11	29	39
17	187	123	150	169	61	11	29	38
18	181	124	150	168	67	11	29	44
19	190	124	150	175	56	11	29	33
20	178	122	150	168	68	12	29	33
21	178	122	150	168	69	13	29	33
22	178	122	150	168	70	14	29	33
23	178	122	150	168	71	15	29	33
24	178	122	150	168	72	16	29	33
25	178	122	150	168	73	17	29	33
26	178	122	150	168	74	18	29	33
27	178	122	150	168	75	19	29	33
28	178	122	150	168	76	20	29	33
29	178	122	150	168	77	21	29	33
30	178	122	150	168	78	22	29	33
31	178	122	150	168	79	23	29	33
32	178	122	150	168	80	24	29	33
33	178	122	150	168	81	11	30	33
34	178	122	150	168	82	11	31	33
35	178	122	150	168	83	11	32	33
36	178	122	150	168	58	11	29	35
37	178	122	150	168	84	11	29	45
38	178	122	150	168	85	11	29	261

ES 2 389 780 T3

(continuación)

Fab N°	LCVR	CDR1 ligera	CDR2 ligera	CDR3 ligera	HCVR	CDR1 H	CDR2 H	CDR3 H
39	178	122	150	168	86	11	29	47
40	178	122	150	168	87	11	29	48
41	178	122	150	168	88	11	29	49
42	178	122	150	168	89	11	29	50
43	178	122	150	168	90	11	29	51
44	178	122	150	168	91	11	29	52
45	178	122	150	168	92	11	29	53
46	178	122	150	168	93	11	29	54
47	191	125	150	168	56	11	29	33
48	192	126	150	168	56	11	29	33
49	193	127	150	168	56	11	29	33
50	194	128	150	168	56	11	29	33
51	195	129	150	168	56	11	29	33
52	196	130	150	168	56	11	29	33
53	197	131	150	168	56	11	29	33
54	198	132	150	168	56	11	29	33
55	199	133	150	168	56	11	29	33
56	200	134	150	168	56	11	29	33
57	201	135	150	168	56	11	29	33
58	202	136	150	168	56	11	29	33
59	203	137	150	168	56	11	29	33
60	204	138	150	168	56	11	29	33
61	205	139	150	168	56	11	29	33
62	206	140	150	168	56	11	29	33
63	199	133	150	168	56	11	29	33
64	207	141	150	168	56	11	29	33
65	208	142	150	168	56	11	29	33
66	209	143	150	168	56	11	29	33
67	210	144	150	168	56	11	29	33
68	211	122	151	168	56	11	29	33
69	212	122	150	176	56	11	29	33
70	213	122	150	177	56	11	29	33
71	214	145	150	168	94	25	29	46
72	191	125	150	168	95	26	29	46
73	215	146	150	168	96	26	29	55
74	199	133	150	168	97	26	29	48
75	178	122	150	168	95	26	29	46
76	199	133	150	168	95	26	29	46
78	178	122	150	168	98	26	29	47
79	195	129	150	168	99	27	29	46
80	195	129	150	168	97	26	29	48
82	199	133	150	168	98	26	29	47
84	199	133	150	168	100	26	29	52
85	191	125	150	168	98	26	29	47
86	191	125	150	168	95	26	29	46
87	216	147	150	168	95	26	29	46
88	199	133	150	168	94	25	29	46
89	196	130	150	168	100	26	29	52
91	195	129	150	168	97	26	29	48
92	216	147	150	168	97	26	29	48
93	195	129	150	168	101	27	29	48
94	199	133	150	168	95	26	29	46
95	217	130	152	168	98	26	29	47
96	218	125	153	168	102	26	32	46
97	219	145	154	168	97	26	29	48
98	199	133	150	168	98	26	29	47
99	199	133	150	168	95	26	29	46
100	220	125	155	168	103	26	32	33
101	221	133	156	168	95	26	29	46
102	222	148	157	168	95	26	29	46

ES 2 389 780 T3

(continuación)

Fab N°	LCVR	CDR1 ligera	CDR2 ligera	CDR3 ligera	HCVR	CDR1 H	CDR2 H	CDR3 H
103	223	130	158	168	104	26	32	46
104	224	145	159	168	104	26	32	46
105	225	130	150	169	105	26	32	47
106	226	133	160	168	106	26	29	47
107	227	130	161	169	107	25	32	48
108	228	133	162	169	108	25	29	47
109	229	130	163	168	109	27	32	46
110	230	131	164	169	100	26	29	52
111	231	146	165	168	95	26	29	46
112	232	125	166	168	97	26	29	48
113	199	133	150	168	110	27	29	47
114	233	129	159	168	106	26	29	47
115	234	133	167	168	106	26	29	47
116	235	149	167	168	110	27	29	47
117	236	125	167	168	111	28	32	53
118	234	133	167	168	112	26	30	53
119	237	122	167	168	100	26	29	52
120	238	122	167	169	112	28	30	46
121	239	147	167	169	113	28	32	46
122	237	122	167	168	114	26	30	53
123	236	125	167	168	115	26	29	53
124	240	131	167	168	116	11	30	53
125	178	122	150	168	117	26	32	52
126	241	131	167	168	118	26	30	52
127	241	131	167	168	106	26	29	47
128	242	129	167	169	119	27	30	47
129	236	125	167	168	120	26	30	52
130	243	129	167	168	119	27	30	47
131	236	125	167	168	117	26	32	52
132	236	125	167	168	121	27	30	52

Tabla 2 Alineamientos de CDR de cadena pesada

Fab N°	CDR1	SEC ID N°	CDR2	SEC ID N°	CDR3	SEC ID N°
1	<b><u>GYSFTDYNMN</u></b>	11	<b><u>VINPNYGTTDYNQRFKG</u></b>	29	<b><u>YDYATGTGAY</u></b>	33
2	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYWTGTGGY	34
3	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
4	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYWTGTGAY	35
5	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGLY	36
6	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGGY	37
7	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
8	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGVY	38
9	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYHTGTGGY	39
10	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGGY	37
11	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGVY	38
12	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGTY	40
13	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGGY	41
14	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGPY	42
15	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYHTGTGGY	43
16	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYHTGTGGY	39
17	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGVY	38
18	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYSTGTGGY	44
19	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
20	GYSFTDYNIN	12	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
21	GYSFTDYNLN	13	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
22	GYSFGDYNMN	14	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
23	GYSFRDYNMN	15	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
24	GYSFTWYNMN	16	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
25	GYSFNDYNMN	17	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
26	GYSFTDYNMS	18	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33

ES 2 389 780 T3

Fab N°	CDR1	SEC ID N°	(continuación)		SEC ID N°	CDR3	SEC ID N°
			CDR2	SEC ID N°			
27	GYSFTDYNIN	19	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
28	GYSFPDYNMN	20	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
29	HYSFTDYNMN	21	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
30	G <sup>H</sup> FTDYNMN	22	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
31	G <sup>P</sup> F <sup>T</sup> TDYNMN	23	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
32	GYSFTD <sup>E</sup> NMN	24	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
33	GYSFTDYNMN	11	VINP <sup>M</sup> YGTTDYNQRFKG	30	YDYATGTGAY	33	
34	GYSFTDYNMN	11	VINP <sup>A</sup> YGTTDYNQRFKG	31	YDYATGTGAY	33	
35	GYSFTDYNMN	11	VINP <sup>E</sup> YGTTDYNQRFKG	32	YDYATGTGAY	33	
36	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <sup>W</sup> TGTGAY	35	
37	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <sup>S</sup> TGTGAY	45	
38	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YD <sup>A</sup> FTGTGAY	261	
39	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YD <sup>Y</sup> FTGTGAY	47	
40	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <sup>H</sup> TGTGAY	48	
41	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <sup>L</sup> TGTGAY	49	
42	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYAT <sup>S</sup> TGAY	50	
43	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYA <sup>P</sup> TGTGAY	51	
44	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <sup>F</sup> TGTG <sup>V</sup> Y	52	
45	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YD <sup>Y</sup> FTGTG <sup>V</sup> Y	53	
46	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDPATGTGAY	54	
47	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
48	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
49	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
50	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
51	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
52	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
53	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
54	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
55	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
56	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
57	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
58	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
59	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
60	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
61	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
62	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
63	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
64	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
65	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
66	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
67	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
68	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
69	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
70	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33	
71	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>LG</u>	25	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGAY	46	
72	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGAY	46	
73	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYHTGTG <sup>V</sup> Y	55	
74	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYHTGTGAY	48	
75	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGAY	46	
76	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGAY	46	
78	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <sup>Y</sup> TGTGAY	47	
79	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>MS</u>	27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGAY	46	
80	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYHTGTGAY	48	
82	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <sup>Y</sup> TGTGAY	47	
84	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTG <sup>V</sup> Y	52	
85	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <sup>Y</sup> TGTGAY	47	
86	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGAY	46	
87	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGAY	46	
88	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>LG</u>	25	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGAY	46	
89	GYSFTDY <sup>H</sup> <u>I</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTG <sup>V</sup> Y	52	

ES 2 389 780 T3

Fab N°	CDR1	SEC ID N°	(continuación)		SEC ID N°	CDR3	SEC ID N°
			CDR2	SEC ID N°			
91	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48	
92	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48	
93	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48	
94	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
95	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
96	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
97	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48	
98	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
99	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
100	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDYATGTGAY	33	
101	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
102	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
103	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
104	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
105	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
106	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
107	GYSFTDY <u>HLG</u>	25	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDYU <u>H</u> TGTGAY	48	
108	GYSFTDY <u>HLG</u>	25	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
109	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
110	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGVY	52	
111	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
112	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48	
113	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
114	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
115	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
116	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGVY	47	
117	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>Y</u> TGTGY	53	
118	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPMYGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGVY	53	
119	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGVY	52	
120	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINPMYGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
121	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46	
122	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPMYGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGVY	53	
123	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGVY	53	
124	GYSFTDY <u>NMN</u>	11	VINPMYGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGVY	53	
125	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGVY	52	
126	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPMYGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTGVY	52	
127	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
128	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPMYGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
129	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPMYGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTGVY	52	
130	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPMYGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47	
131	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTDDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGVY	52	
132	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPMYGTDDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTGVY	52	

Consenso:

SEC ID N°: 244  
 X1YX3FX5X6X7X8X9X10  
 X1 es H o G  
 X3 es S, H o P  
 X5 es G, R, T, N o P  
 X6 es D o W  
 X7 es Y o F  
 X8 es N o H  
 X9 es M, T, L o I  
 X10 es N, G, H o S

SEC ID N°: 245  
 VINPX5YGTDDYNQRFKG  
 X5 es N, A, M o E

SEC ID N°: 246  
 YDX3X4X5X6TGX9Y  
 X3 es Y, A o P  
 X4 es Y, F, H, S, W, L o A  
 X5 es T o P  
 X6 es G o S  
 X9 es A, G, L, V, P o T

5

Tabla 3 Alineamientos de CDR de cadena ligera

Fab N°	CDR1	SEC ID N°:	CDR2	SEC ID N°:	CDR3	SEC ID N°:
1	<u>RSSQSLVHSRGNTYLH</u>	122	<u>KVSNRFS</u>	150	<u>SQSTHLPFT</u>	168
2	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHYPFT	169
3	RSSQSLVHSHGNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
4	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168

ES 2 389 780 T3

(continuación)

Fab N°	CDR1	SEC ID N°:	CDR2	SEC ID N°:	CDR3	SEC ID N°:
5	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHYPFT	169
6	RSSQSLVHSNGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHYPFT	169
7	RSSQSLVHSYGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHYPFT	170
8	RSSQSLVHSNGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSLHVPFT	171
9	RSSQSLVHSNGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHYPFT	170
10	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
11	RSSQSLVHSNGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
12	RSSQSLVHSNGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHEPFT	172
13	RSSQSLVHSHGNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTHYPFT	169
14	RSSQSLVHSHGNTYLH	123	KVSNRFS	150	NQSTHVPFT	173
15	RSSQSLVHSNGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQITHVPFT	174
16	RSSQSLVHSNGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
17	RSSQSLVHSHGNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTHYPFT	169
18	RSSQSLVHSNGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
19	RSSQSLVHSNGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSMHVPFT	175
20	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
21	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
22	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
23	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
24	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
25	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
26	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
27	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
28	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
29	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
30	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
31	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
32	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
33	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
34	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
35	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
36	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
37	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
38	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
39	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
40	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
41	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
42	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
43	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
44	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
45	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
46	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
47	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
48	RSSQSLVHSRGNTYLH	126	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
49	VSSQSLVHSRGNTYLH	127	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
50	RSSASLVHSRGNTYLH	128	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
51	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
52	RSSQSLRHSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
53	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
54	RSHQSLVHSRGNTYLH	132	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
55	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
56	RSSQSLVHNRGNTYLH	134	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
57	RSSQSLVHSRGRTYLH	135	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
58	RSSQSLVH_RRGNTYLH	136	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
59	RSSQSLVHSRGNTYTH	137	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
60	RSSQSLVHSRGNTYSH	138	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
61	RSSQSLVHSRGNTYHH	139	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
62	RSSQSLVHARGNTYLH	140	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
63	RSSQSLVHSRGNTYEH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
64	RSSQSLVHSRGNTWYLH	141	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
65	RSSQSLVHSRGNTVYLH	142	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
66	RSSQSLVHSRGKTYLR	143	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
67	RSSQSLVHLRGNTYLH	144	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
68	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	167	SQSTHLPFT	168

ES 2 389 780 T3

(continuación)

Fab N°	CDR1	SEC ID N°:	CDR2	SEC ID N°:	CDR3	SEC ID N°:
69	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQITHL PFT	176
70	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTSL PFT	177
71	RSSKSLVHSRGNTFLH	145	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
72	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
73	RSSQSLRHSRGNTFLH	146	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
74	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
75	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
76	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
78	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
79	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
80	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
82	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
84	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
85	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
86	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
87	RSSQSLKHSRGNTFLH	147	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
88	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
89	RSSQSLRHSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
91	RSSQSLRHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
92	RSSQSLKHSRGNTFLH	147	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
93	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
94	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
95	RSSQSLRHSRGNTYLH	130	KVSNRFH	152	SQSTHL PFT	168
96	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVANRFS	153	SQSTHL PFT	168
97	RSSKSLVHSRGNTFLH	145	KVSNRFS	154	SQSTHL PFT	168
98	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
99	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
100	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	155	SQSTHL PFT	168
101	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVDNRFS	156	SQSTHL PFT	168
102	RSSRSLVHSRGNTFLH	148	KVSNRFS	157	SQSTHL PFT	168
103	RSSQSL_RHSRGNTYLH	130	KVSNRFS	158	SQSTHL PFT	168
	RSS_KSLVHSRGNT_					
104	FLH	145	KVSNRFS	159	SQSTHL PFT	168
105	RSSQSL_RHSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTH_YPFT	169
106	RSSQSLVHSRGNTFLH	133	KVSNRFS	160	SQSTHL PFT	168
107	RSSQSLR_HSRGNTYLH	130	KVSNRFS	161	SQSTH_YPFT	169
108	RSSQSLVHSRGNT_FLH	133	KVSNRFS	162	SQSTH_YPFT	169
109	RSSQSLRHSRGNTYLH	130	KVSNRFS	163	SQSTHL PFT	168
110	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFT	164	SQSTH_YPFT	169
111	RSSQSLRHSRGNT_FLH	146	KVSNRFS	165	SQSTHL PFT	168
112	RSSRSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	166	SQSTHL PFT	168
113	RSSQSLVHSRGNT_FLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
114	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	159	SQSTHL PFT	168
115	RSSQSLVHSRGNT_FLH	133	KVSNRFS	167	SQSTHL PFT	168
116	RSSQSLKfiSHGNTYLH	149	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
117	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
118	RSSQSLVHSRGNT_FLH	133	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
119	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
120	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFI	167	SQSTHY PFT	169
121	RSSQSLKfiSRGNT_FLH	147	KVSNRFI	167	SQSTHY PFT	169
122	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
123	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
124	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
125	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHL PFT	168
126	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFS	167	SQSTHL PFT	168
127	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
128	RSSQSLRHSRGNTYLH	129	KVSNRFI	167	SQSTHY PFT	169
129	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
130	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
131	RSSR_SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168
132	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167	SQSTHL PFT	168

Consenso:

SEC ID N°: 247  
 X1SX3X4SX6X7HX9X10GX12X13X14X15H  
 X1 es R o V  
 X3 es S o H  
 X4 es Q, K, R o A  
 X6 es V o L  
 X7 es R, V o K  
 X9 es S, N, R, A o L  
 X10 es H,R,N o Y  
 X12 es N, K o R  
 X13 es T o V  
 X14 es F, Y o W  
 X15 es L, T, S, H o F

SEC ID N°: 248  
 X1VX3X4RX6X7  
 X13 es K o I  
 X3 es S, A, D, T, R, H o P  
 X4 es N, V o T  
 X5 es R, I o N  
 X6 es F, I o N o  
 X7 es S, H, I, T o V

SEC ID N°: 249  
 X1QX3X4X5X6PFT  
 X1 es S o N  
 X3 es S o T  
 X4 es T, L o M  
 X5 es H o S  
 X6 es L, I, V, E o Y

**Ejemplos**

**Ejemplo 1 ELISA I: Unión de anticuerpos a IL-17 de diversas especies**

5 Un ejemplo de ensayo ELISA para medir la unión de anticuerpos a IL-17 usa placas de microvaloración Costar 3366 selladas que se recubren durante la noche a 4 °C con 50 µl de 1,0 µg/ml de IL-17 humana por pocillo (R&D Systems, N° ref:317-IL/CF) en tampón de recubrimiento de carbonato (carbonato de sodio 50 mM, pH 9,0). Alternativamente, se usan IL-17 de ratón, de conejo o de mono cynomolgus. Se usa IL-22 humana (R&D Systems) como antígeno de control. Las IL-17 de conejo y de mono cynomolgus no están disponibles comercialmente y, por lo tanto, requieren la clonación y expresión, o síntesis artificial, según procedimientos conocidos en la técnica que usan las secuencias de aminoácidos de IL-17 de las diversas especies proporcionadas en la figura 2 (SEC ID N°: 9 y 10). Ejemplos de 10 secuencias de nucleótidos que codifican la IL-17 de las diversas especies se muestran en SEC ID N°: 250-254.

15 La placa se bloquea subsiguientemente añadiendo 100 µl de tampón de bloqueo (Pierce N° ref:37515). La placa se incuba durante 1 hora a 37 °C y después se lava tres veces con tampón de lavado (PBS pH 7,4 y Tween al 0,05 %). Después, se añaden 50 µl de bien anticuerpo de la muestra o bien de anticuerpo de control (diluidos a diferentes concentraciones en PBS (solución salina tamponada con fosfatos), pH 7,4, por ejemplo, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 y 0 µg/ml) a cada pocillo, y la placa se incuba posteriormente durante 1 hora a 37 °C. La placa se lava después tres veces con tampón de lavado antes de añadir 50 µl por pocillo de un conjugado de kappa anti-human kappa-fosfatasa alcalina diluido 1:1000 en PBS, pH 7,4. Las muestras de ensayo se incuban durante 1 hora a 37 °C. Después se 20 prepara en el momento sal de disodio de p-nitrofenil fosfato (PNPP, Pierce N° ref:37620) disolviendo en dietenolamino tampón de sustrato según las instrucciones del fabricante y se añaden 50 µl a cada pocillo. Se permite que tenga lugar el desarrollo de color durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente y después se mide la señal de color mediante absorbancia a 405 nm usando un lector de placas de ELISA. El grado de unión es proporcional a la producción de señal de color.

25 Los anticuerpos de la invención se unen a IL-17 humana en un ensayo ELISA tal como se describe en el presente documento, pero no se unen a IL-17 de rata o de ratón. Se anticipa, dados los datos de Biacore del ejemplo 4 que demuestran que los anticuerpos de la invención se unen a IL-17 humana o de mono, que los anticuerpos de la invención también demostrarían la unión a IL-17 de mono en un ensayo ELISA tal como se describe en el presente documento.

**Ejemplo 2 ELISA II: Unión del anticuerpo a proteínas de la familia IL-17**

30 Se usó un ELISA para medir si los anticuerpos de la invención se unen selectiva y/o de forma preferencial a miembros particulares de IL-17 humana (por ejemplo, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F) o IL-22 humana (control negativo).

35 En un ejemplo de ensayo, los pocillos de la placa de ELISA (Nunc Immuno Maxisorp) se recubren con 100 µl (0,5 µg/ml en 1X tampón de recubrimiento (BioF<sub>x</sub>)) de proteínas miembros de la familia IL-17 (R&D Systems) se sellan y se incuban durante la noche a 4 °C. La solución de los pocillos se elimina mediante desplazamiento y se añade tampón de bloqueo (200 µl de BSA al 1,5 % en PBS). Las placas se incuban en un agitador giratorio durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se añaden 100 µl del anticuerpo que se va a analizar por pocillo a diferentes concentraciones (por ejemplo, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 y 0 µg/ml). Las placas se incuban de nuevo durante la noche (4 °C) seguido de un calentamiento en un agitador giratorio (60 min, a temperatura ambiente). 40 Cada pocillo de la placa se lava después cinco veces con tampón (1X tampón Ish, BioF<sub>x</sub>). Después de lavar, se añade un anticuerpo secundario conjugado a HRP disponible comercialmente apropiado (1:2000 en PBS con BSA (albúmina de suero bovino) al 1,5 %) (100 µl/pocillo). Las placas se vuelven a incuban en un agitador giratorio (60 min, temperatura ambiente) seguido por lavado con tampón (5X) tal como se ha descrito anteriormente. La señal colorimétrica se desarrolla añadiendo TMB (100 µl/pocillo) hasta saturación (aprox 3-5 min) y después se finaliza un desarrollo adicional añadiendo solución de detención (100 µl/pocillo, BioF<sub>x</sub>). La señal de color se mide a 450 nm de 45

absorbancia usando cualquier lector de placas de ELISA apropiado. El grado de unión es proporcional a la producción de señal de color. Los anticuerpos de la invención (por ejemplo, Fabs 103, 104, 118, 121, 126 y 131 tal como se describen en la tabla 1) se unen específicamente a IL-17 humana (es decir, IL-17A), pero, en condiciones similares, no se unen a niveles superiores la nivel de fondo a IL-17B humana, IL-17C humana, IL-17D humana, IL-17E humana, IL-17F humana, IL-17 murina o IL-22 humana.

### Ejemplo 3 Aislamiento y activación de células para la clonación de IL-17

#### A. Esplenocitos de rata

Usando tenazas y tijeras estériles, se retira el bazo de una rata sacrificada mediante inhalación de CO<sub>2</sub> y se coloca el bazo en un tubo que contiene 5 ml de medio RPMI 1640 + suero de bovino fetal al 10 % y penicilina/estreptomicina (solución de medio). Se vierte el contenido del tubo en un disco de Petri de 10 cm y se retira la grasa del bazo. Se homogeneiza el bazo usando cuidadosamente un par de portaobjetos de microscopia sometidos previamente al autoclave totalmente congelados. Se lavan las células de los portaobjetos usando solución de medio, se pipetea unas pocas veces y se filtran las células a través de un cedazo de células (Fisher Scientific). Se lavan las células una vez con solución de medio, se realiza el recuento de células y se resuspenden a una concentración final de  $2 \times 10^7$  células/ml en 80 ml. Se añade la solución de células a una recipiente T150, se añade ConcanavalinA a una concentración final de 3 µg/ml y se incuba a 37 °C durante aproximadamente 15 horas. Se recolectan las células, se lavan con PBS, se congela la pella de células sobre hielo seco y se procede inmediatamente a la realización de procedimientos de aislamiento de ARN estándar.

#### B. Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de mono cynomolgus y de conejo

Se cargan aproximadamente 7 ml de sangre completa de mono cynomolgus o 10 ml de sangre completa de conejo blanco de Nueva Zelanda en un sistema BD Vacutainer™ CPT™ para realizar la separación de células mononucleares de la sangre completa. Se centrifuga el tubo con la preparación de células CPT durante 20 min a 1500 x gravedad en un rotor de cubeta oscilante horizontal. Se recogen linfocitos y monocitos en la interfase, se lavan dos veces con solución de medio, se realiza el recuento y se resuspenden en solución de medio a una concentración final de  $10^6$  células/ml. Se añade concanavalina A a una concentración final de 3 µg/ml y se incuba a 37 °C durante aproximadamente 15 horas. Se recolectan las células, se lavan con PBS, se congela la pella de células sobre hielo seco y se procede inmediatamente a la realización de procedimientos de aislamiento de ARN estándar.

### Ejemplo 4 Medición de las constantes cinéticas de unión

Se usa un instrumento BIACORE® 2000 para medir la cinética y la afinidad de unión antígeno-anticuerpo. El instrumento usa las propiedades ópticas de resonancia de plasmón superficial para detectar alteraciones en la concentración de proteínas de moléculas interactuantes dentro de una matriz biosensora de dextrano. Excepto cuando se indica, todos los reactivos y materiales se adquirieron de BIACORE® AB. Todas las mediciones se realizan a 25 °C. Las muestras se resuspenden en tampón HBS-EP a una concentración final de 2 µg/ml (cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P-20 al 0,005 % (p/v) y HEPES 10 mM, pH 7,4). Se inmoviliza la proteína A en células de flujo 1 a 4 de un chip sensor CM4 a un nivel de 500 unidades de respuesta usando un kit de acoplamiento amínico.

La unión se evalúa usando múltiples ciclos analíticos. Cada ciclo se realiza a una velocidad de flujo de 50 µl/minuto y consta de las etapas siguientes: Inyección de aproximadamente 20 µl de una composición de anticuerpo a 2 µg/ml dirigida a la captura de 100-200 unidades de respuesta, inyección de 250 µl de IL-17 humana, IL-17 de mono cynomolgus, IL-17 de conejo blanco de Nueva Zelanda, IL-17 de rata o IL-17 de ratón (comenzando por 10 nM y usando diluciones seriadas dos veces para cada ciclo), seguido por 20 minutos para la disociación, y regeneración usando 30 µl de clorhidrato de glicina 10 mM, pH 1,5. Las constantes de asociación y disociación para cada ciclo se evalúan usando un modelo de unión "1:1 con transferencia de masa" en un programa informático BIAevaluation.

Los mAb de longitud completa 103, 104, 118, 121, 126 y 131 (véase la tabla 1) que tienen una región Fc de IgG<sub>4</sub> muestran una unión de afinidad alta a la IL-17 humana y a la IL-17 de mono con una K<sub>D</sub> inferior a 5 pM, una K<sub>off</sub> más lenta que  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  y una K<sub>on</sub> de al menos  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . La K<sub>D</sub> y la k<sub>off</sub> se mejoran (es decir, K<sub>D</sub> inferior, k<sub>off</sub> más lenta) en estas variantes de mAb mediante mAb Fab 2321 (Fab parental de, por ejemplo, Fab 103 y 104) que comprenden una región variable murina [SEC ID N°: 261 (VH de 2321), 262 (VL de 2321)], una región constante de cadena pesada de IgG<sub>4</sub> humana (SEC ID N°: 260) y regiones constante de cadena ligera kappa (SEC ID N°: 272). Los anticuerpos de la invención muestran una unión no superior a los niveles de fondo a IL-17 de ratón o IL-17 de rata; no se detecta unión hasta una concentración 200 nM de IL-17 de ratón y no se detecta unión hasta una concentración 1 µM de IL-17 de rata. Cuando se analizan los mAb de longitud completa 103, 104, 121 y 126, en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, para determinar su unión a IL-17 de mono cynomolgus y IL-17 de conejo, la unión a IL-17 de conejo es débil y bifásica mientras que la unión a IL-17 de mono es similar a la unión a IL-17 humana. Los valores específicos para determinados mAb (los valores se indican como media ± error estándar de la media) de la invención cuando se analizan en este ensayo se enumeran en la tabla 4 más adelante. Se contempla que regiones Fc diferentes a las de IgG<sub>4</sub> no afectarán significativamente a la K<sub>D</sub> y a la K<sub>off</sub>.

Tabla 4

<b>IL-17 HUMANA</b>	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(pM)$
mAb 103	$11 (\pm 2) \times 10^6$	$1,5 (\pm 0,7) \times 10^{-5}$	$1,4 (\pm 0,7)$
mAb 104	$7,7 (\pm 0,6) \times 10^6$	$1,1 (\pm 0,5) \times 10^{-5}$	$1,7 (\pm 0,9)$
mAb 118	$5 \times 10^6$	$2 \times 10^{-5}$	3,9
mAb 121	$10 (\pm 0,9) \times 10^6$	$1,5 (\pm 0,3) \times 10^{-5}$	$1,6 (\pm 0,4)$
mAb 126	$7,5 (\pm 0,4) \times 10^6$	$1,3 (\pm 0,2) \times 10^{-5}$	$1,8 (\pm 0,3)$
mAb 131	$5,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-5}$	2,9
MAb 2321 parental	$2,7 \times 10^6$	$6 \times 10^{-5}$	7
<b>IL-17 CYNO</b>	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D (pM)$
mAb 103	$8,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{-5}$	1,3
mAb 104	$9,4 \times 10^6$	$0,5 \times 10^{-5}$	0,5
mAb 121	$7,8 (\pm 0,3) \times 10^6$	$0,7 (\pm 0,2) \times 10^{-5}$	$1,1 (\pm 0,04)$
mAb 126	$7,9 (\pm 0,3) \times 10^6$	$0,7 (\pm 0,6) \times 10^{-5}$	$0,8 (\pm 0,8)$
<b>IL-17<sup>a</sup> DE CONEJO</b>	$k_{on} (M^{-1} s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D (pM)$
mAb 103	$1,8 \times 10^5$ $10,6 \times 10^6$	$3,6 \times 10^{-4}$ $19,2 \times 10^{-2}$	2 18,1
mAb 104	$1,0 (\pm 0,1) \times 10^5$ $4,0 (\pm 2) \times 10^6$	$1,8 (\pm 1,0) \times 10^{-4}$ $7,0 (\pm 2) \times 10^{-2}$	$1,9 (\pm 1,3)$ $20 (\pm 6)$
mAb 121	$8 (\pm 6) \times 10^5$ $17 (\pm 11) \times 10^6$	$4 (\pm 3) \times 10^{-4}$ $2,1 (\pm 0,2) \times 10^{-2}$	$0,51 (\pm 0,13)$ $1,5 (\pm 1,0)$
mAb 126	$1,5 (\pm 0,6) \times 10^5$ $9 (\pm 3) \times 10^6$	$1,7 (\pm 0,5) \times 10^{-4}$ $11 (\pm 2) \times 10^{-2}$	$1,3 (\pm 0,6)$ $14 (\pm 4,0)$

<sup>a</sup>La unión es bifásica y el ajuste de datos con modelo de unión de ligando heterogéneo resultante en dos afinidades.

### Ejemplo 5 Estudios de competencia de unión a receptor de IL-17/anticuerpo anti-IL-17

Este ejemplo demuestra que los anticuerpos de la invención compiten por la unión a IL-17 con el receptor de IL-17.

- 5 Los estudios de unión en BIACORE se realizan usando la proteína de fusión receptor de IL-17 Fc (R&D N° ref:177-IR). Para demostrar que la proteína de fusión receptor de IL-17 Fc se une a IL-17 humana, se realiza un ensayo en BIACORE en tampón de unión BIACORE (HBS-EP) + 1 mg/ml de BSA a 25 °C en un instrumento BIACORE 2000. Se usó un chip CM4 con aproximadamente 600 unidades de respuesta de proteína A inmovilizada en células de flujo 1, 2 y 3 del chip. Se capturaron aproximadamente 100 unidades de respuesta de la proteína de fusión receptor de IL-17 Fc en la célula de flujo 2 del chip. La IL-17 humana se expuso después a células de flujo 1 y 2 en concentraciones que varían de 600 nM a 9,4 nM. Después de cada inyección de 250 µl de IL-17 humana, se permite que el complejo se disocie durante aproximadamente 12 minutos haciendo pasar tampón a través del chip. Al finalizar la disociación, se usa una inyección de 20 µl de glicina 100 mM, pH 1,5, para regenerar el chip antes de comenzar el siguiente ciclo de unión. La célula de flujo 1 se usa como una célula de flujo de referencia. Los datos se ajustan usando el modelo de "analito bivalente" en el programa informático BIAevaluation versión 3.2. Los resultados indican que esta interacción tiene una constante de asociación de  $1,06 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ , una constante de disociación rápida de  $20,3 s^{-1}$  y una constante de disociación lenta de  $1,63 \times 10^{-4} s^{-1}$ . Por lo tanto, esta interacción tiene una  $K_D$  o afinidad de unión de 1,5 nM y 0,19 mM que es mucho más débil que las afinidades de unión de los anticuerpos de la invención a IL-17 humana.
- 10
- 15
- 20 La unión para el experimento de competencia también se mide en HBS-EP + 1 mg/ml BSA a 25 °C en un instrumento BIACORE 2000 con un chip CM4. Aproximadamente 1000 unidades de respuesta de un anticuerpo de la invención están inmovilizadas en células de flujo 2, 3 y 4 del chip; la célula de flujo 1 se deja como blanco. Usando una velocidad de flujo de 50 µl/ml, se inyectan 25 µl de IL-17 humana 500 nM en las cuatro células de flujo, formando el complejo anticuerpo:antígeno en la superficie del chip. Después de completar la inyección y de formarse el complejo, se inyectan 250 µl de proteína de fusión receptor de IL-17 humana Fc 500 nM a las cuatro células de flujo. Al finalizar esta inyección se usa una inyección de 25 µl de glicina 100 mM, pH 1,5, para regenerar el chip: El mismo experimento de unión se repite después usando una inyección de 250 µl de tampón en vez de proteína de fusión receptor de IL-17 Fc.
- 25
- 30 Los perfiles de unión para la inyección de receptor al complejo anticuerpo:antígeno y para la inyección de control de tampón al complejo anticuerpo:antígeno son idénticos. Esto indica que no existen sitios de unión disponibles para que la IL-17 dimérica se una a su receptor una vez se ha unido a un anticuerpo de la invención. Este resultado también indica que el receptor no es capaz de "desplazar" la IL-17 de ninguno de los anticuerpos una vez se ha formado el complejo. Estos anticuerpos pueden inhibir la IL-17 humana de que se una a su receptor, neutralizando, por lo tanto, la actividad biológica de la IL-17 humana.

**Ejemplo 6A Ensayo indicador de IL-8 *in vitro***

Para analizar la capacidad de un anticuerpo de la invención para neutralizar o antagonizar la bioactividad de una IL-17, se puede usar el ensayo indicador de IL-8 descrito en el presente documento. Este enfoque también puede usarse para determinar la potencia de Fab o mAb de la invención en un ensayo basado en células. La línea celular HS27 humana (ATCC N° ref:CRL-1634) segrega la IL-8 en respuesta a la IL-17. La secreción de IL-8 inducida por IL-17 se inhibe neutralizando anticuerpos anti-IL-17 (Véase, por ejemplo, J. Imm. 155:5483-5486, 1995 o Cytokine 9:794-800, 1997). En consecuencia, la secreción de IL-8 inducida por IL-17 debería tener lugar de forma no limitada si se añade suficiente IL-17 a células HS27 en ausencia de anticuerpo anti-IL-17 neutralizador.

Las células HS27 se mantienen en medio de ensayo: medio DMEM con alta concentración de glucosa que carece de rojo fenol (Invitrogen N° ref:31053-028) con suero de bovino fetal al 10 %, L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina G (100 U/500 ml) y estreptomina (100 µg/500 ml). Las células se cultivan en recipientes T 150 hasta que son aproximadamente el 80-90 % confluentes el día del ensayo. Se reconstituye IL-17 humana (R&D Systems, N° ref:317-IL-050) en PBS esteril sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> almacenado congelado, descongelado recientemente para su uso y diluido a 200 ng/ml en medio de ensayo. Se añade una parte alícuota de 50 µl de la IL-17 diluida a cada pocillo de una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos (Falcon N° ref:35-3072) dejando vacíos los pocillos exteriores. Se usan pocillos por duplicado para un control de sólo el medio (100 µl/pocillo) y un control de sólo la IL-17 (100 µl/pocillos). El análisis se realiza por duplicado o por triplicado. Se diluyen proteínas mAb de longitud completa a una concentración máxima de 24 mg/ml de medio de ensayo. Se realizan diluciones seriadas (típicamente 1:5) en una placa de ensayo aparte y se añaden 50 µl de las muestras de Fab a diversas diluciones a los pocillos que contienen la IL-17 y después se incuban a 37 °C durante 1 hora. El medio de ensayo solo se usa como control negativo.

Se añaden células HS27 (típicamente 20.000 células en 100 µl de medio de ensayo) a cada pocillo de la placa que contiene Fab + IL-17 (o controles) y se incuban durante 48 horas a 37 °C. Después, los sobrenadantes del medio se recogen después de la centrifugación de las placas de 96 pocillos durante 5 minutos a 500 veces la gravedad y se diluyen 1:15 o 1:10 en medio de ensayo. El nivel de neutralización de IL-17 se mide determinando las cantidades de IL-8 en el sobrenadante usando un kit de ELISA comercial siguiendo las instrucciones del fabricante excepto que el medio de ensayo se sustituye por diluyente estándar y el volumen de sustrato es de 100 µl/pocillo (R&D Systems, ELISA D-8000C o R&D DuoSet ELISA N° ref:DY208hIL-8). Las mediciones de ELISA (450 nm) se toman en un lector de microplacas. Las curvas de calibración se obtienen usando un ajuste logístico de 4 parámetros con valores de IL-8 (pg/ml) determinados a partir de las curvas de calibración usando técnicas estadísticas estándar. Los valores de CI<sub>50</sub> se obtienen usando técnicas estadísticas estándar.

Los mAb de longitud completa 103, 104, 121 y 126 de la invención (con región Fc de IgG<sub>4</sub>), cuando se analizan en el ensayo descrito (2-4 repeticiones), tienen una CI<sub>50</sub> media (basada en un peso molecular estimado de 150 kD para cada mAb) de entre 450 y 500 pM, estando el intervalo de todos los valores medidos entre 365 y 618 pM.

**Ejemplo 6B Ensayo indicador de GRO-α *in vitro***

Para analizar la capacidad de un anticuerpo de la invención para neutralizar o antagonizar la bioactividad de una IL-17, se puede usar el ensayo basado en células siguiente. La IL-17 puede estimular células epiteliales y otras células para que segreguen GRO-α. La capacidad de un anticuerpo de la invención para neutralizar la secreción de GRO-α inducida por IL-17 a partir de la línea celular HT-29 epitelial de adenocarcinoma colorrectal humana se analiza en este ensayo.

Para analizar si la secreción de GRO-α inducida de forma dependiente de la dosis por IL-17 a partir de células HT-29, se diluye IL-17 recombinante (R&D Systems N° ref:317-IL-050/CF, reconstituido en PBS de Dulbecco sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (D-PBS)) (a 4,5 µg/ml; 3X la concentración de ensayo más alta) en medio de ensayo/cultivo (McCoy's 5A (Invitrogen); FSA al 10 % (Invitrogen); penicilina G (100 U/500 ml) y estreptomina (100 µg/500 ml). La IL-17 se diluye serialmente posteriormente (1:5) en medio de ensayo. Se dispensan diversas concentraciones de IL-17 (0,096 ng/ml - 1,500 ng/ml; 3,0 pM - 46,875 pM) (50 µl cada una) en pocillos internos de una placa de 96 pocillos tratados con cultivo tisular. Se dispensa medio de ensayo (50 µl) en 3 pocillos para un tratamiento de "medio solo". El análisis se realiza por triplicado (3 pocillos por tratamiento). La placa que contiene IL-17 en medio de ensayo se incuban durante aproximadamente 60-90 minutos a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % antes de la adición de células HT-29.

Para la evaluación de un anticuerpo de la invención, por ejemplo, mAb 126 con una región Fc de IgG<sub>4</sub>, se usa una concentración de IL-17 que daba aproximadamente el 70 % de secreción de GRO-α de células HT-29 (60 ng/ml). Se diluye IL-17 humana recombinante (R&D Systems) (a 240 ng/ml; 4X concentración de trabajo) en medio de ensayo/cultivo. La IL-17 diluida se dispensa (50 µl) en 60 pocillos interiores separados de placas de 96 pocillos tratadas con cultivo tisular (Becton Dickinson Falcon N° ref:35-3072). Se dispensa medio de ensayo (50 µl) en 3 pocillos para un tratamiento "medio solo".

Un intervalo de dosis de un anticuerpo de la invención que se va a analizar es típicamente de 2,56 – 40.000 pM. En una placa de dilución aparte, el anticuerpo de la invención y el anticuerpo control (estéril, en 1X PBS, pH 7,4) se diluyen a 160.000 pM en medio de ensayo. El anticuerpo de la invención y el anticuerpo de control se diluyen

posteriormente serialmente (1:5) en medio de ensayo. Cada concentración de ensayo del anticuerpo de la invención que se va a analizar se añade después (50 µl) a pocillos que contiene IL-17. El análisis se realiza típicamente por triplicado. Se usa medio de ensayo solo (50 µl) para controles de "medio solo" y "IL-17 solo". Las placas que contiene IL-17 y anticuerpo en medio de ensayo se incuban durante aproximadamente 60-90 minutos a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % antes de la adición de células HT-29.

Las células HT-29 (células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal humano, ATCC N° ref:HTB-38) se mantienen en medio de cultivo/ensayo en recipientes tratados con cultivo tisular usando técnicas estándar. Las células HT-29 se cultivan en recipientes de cultivo tisular hasta que son el 50-80 % confluentes el día del ensayo. El día del ensayo, las células se enjuagan con HBSS (Cambrex N° ref:CC-5024) y se retiran de los recipientes de cultivo con tripsina + EDTA. La tripsina se inactiva con medio de ensayo completo. Después, las células HT-29 se centrifugan a 500X g durante 5 min a TA (temperatura ambiente). La pella de células se resuspende después en medio de ensayo y se añaden 20.000 células HT-29 (en 100 µl) a cada pocillo de tratamiento de las placas de 96 pocillos. Se añade un volumen igual de D-PBS a cada uno de los pocillos laterales no usados (sin células) para reducir los efectos colaterales resultantes de la evaporación. Las placas de 96 pocillos se disponen en una incubadora de cultivo tisular (37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %) durante aproximadamente 48 horas.

Al finalizar el ensayo, las placas se centrifugan (500X g durante 5 min a Ta) y el medio de cultivo celular se transfiere a placas de 96 pocillos de polipropileno. Los niveles de GROα se miden con un ELISA sándwich de GROα (R+D Systems, DuoSet N° ref:DY275) tal como se indica en las instrucciones del fabricante excepto en que: se usa medio de ensayo como diluyente estándar, se usa 1X tampón de lavado de ELISA de BioFX Labs, se usan volumen de muestra y estándar de 50 µl por pocillo, se usa un sustrato de BioFX Labs (sustrato HRP, N° ref:TMBW-1000-01) y se usa una solución de detención de BioFX Labs (N° ref:LSTP-1000-01) (100 µl por pocillo). Al finalizar las reacciones del ELISA, las placas se leen a 450 nm en un lector de microplacas. Las curvas de calibración para GROα se obtienen realizando un ajuste logístico de 4 parámetros. Los valores de GROα (concentración en pg/ml) para las muestras se obtienen a partir de las curvas de calibración. La línea celular epithelial de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 segregó GROα cuando se estimuló con IL-17 de un modo dependiente de la dosis (tabla 5). La IgG4 humana de control no causó una disminución en la secreción de GROα inducida por IL-17. Estos resultados (tabla 6) demuestran que el mAb 126 es capaz de neutralizar completamente la secreción de GROα inducida por IL-17 por parte de células HT-29 *in vitro* usando las condiciones descritas. El valor de CI<sub>50</sub> para mAb 126 en este ensayo es aproximadamente 560 pM.

Tabla 5

IL-17 humana (ng/ml)	GROα PROM (pg/ml)	DEVT
1.500,00	2.420,4	311,8
300,00	2.047,5	509,9
60,00	1.556,0	209,0
12,00	960,0	24,9
2,40	502,5	12,3
0,48	297,9	6,3
0,10	205,8	4,8
0	149,2	16,7

Abreviaturas: PROM = promedio; DEVT = desviación típica

Tabla 6

Concentración de anticuerpo, pM	mAb 126		IgG4 negative control	
	GROα PROM, pg/ml	DEVT	GROα PROM, pg/ml	DEVT
40.000,0	123,8	1,4	1.297,3	29,4
8.000,0	134,1	6,4	1.419,9	133,4
1.600,0	151,3	9,5	1.370,4	114,7
320,0	1.170,6	56,0	1.388,6	54,1
64,0	1.340,8	59,1	1.380,4	36,0
12,8	1.362,0	21,1	1.346,2	81,6
2,56	1.280,9	56,1	1.243,4	118,3
0 (IL-17 solo)	1.201,4	66,1		
Medio solo	117,2	10,0		

Abreviaturas: PROM = promedio; DEVT = desviación típica

**Ejemplo 7 Neutralización *In vivo* de IL-17h**

La IL-17 humana es capaz de unirse y estimular el receptor de IL-17, dando como resultado una elevación y la subsiguiente secreción de quimiocina KC de ratón (CXCL1). Se realizan experimentos que varían el tiempo y la dosis para identificar la dosis óptima de IL-17 humana y el tiempo óptimo para la inducción de KC de ratón. Estos experimentos indican que una dosis de 150 µg/kg de IL-17 humana y un tiempo de 2 horas después de la administración de IL-17 da niveles máximos de KC en suero de ratón. Los anticuerpos de longitud completa de la presente invención (por ejemplo, Fab 126 o Fab 121 con HCVR unida operativamente a Fc de IgG<sub>4</sub>, SEC ID N°: 260 [o SEC ID N°: 278] y la LCVR unida operativamente a una región constante kappa humana, SEC ID N°: 263 [o SEC ID N°: 277]) se administran intravenosamente a ratones a 1, 10, 100 y 1000 µg/kg una hora antes de una inyección subcutánea de IL-17 humana. A las dos horas después de la administración de IL-17 humana, los ratones se sacrifican y se determinan niveles de KC mediante ELISA usando un kit disponible comercialmente según las instrucciones del fabricante (KC Quantikine, R&D). Se usa como controles negativos anticuerpos emparejados con isotipos. Los anticuerpos bloquean la capacidad de IL-17 humana para estimular el receptor de IL-17 de ratón, causando la inhibición de la elevación de KC de ratón, de un modo dependiente de la dosis. El mab126 (un anticuerpo de longitud completa que comprende Fab 126), a una dosis de 20 µg/ratón en las condiciones descritas, disminuye el nivel de KC promedio en aproximadamente cuatro veces en comparación con un anticuerpo control que no tiene efecto. El mab 121, a una dosis de 20 µg/ratón en las condiciones descritas, disminuye el nivel de KC promedio en aproximadamente tres veces en comparación con el anticuerpo de control.

**Ejemplo 8 Cartografía de epítopes**

Se usan dos de los anticuerpos anti-IL-17 (Fab 126 y Fab 104) para determinar que la humanización y optimización del Fab murino parental (2321, SEC ID N°: 261 y 262) no altera la capacidad de unión al epítipo de las Fab resultantes de la humanización y optimización del compuesto parental. Las Fab optimizadas humanizadas se unen al mismo epítipo que el Fab murino parental según se determina mediante un ELISA de competencia estándar o mediante intercambio H-D y análisis de espectroscopia de masas para cartografiar el epítipo (Véase, por ejemplo, Hoofnagle, A. y col., *Methods Mol. Biol.* 250:283-298, 2004; Hoofnagle, A. y col., *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 32:1-25, 2003; Baerga-Ortiz, A. y col., *Protein Sci.* 11:1300-8, 2002) por lo tanto, los Fab 1-132 de la invención derivados del mismo Fab parental, se espera que se unan al mismo epítipo.

Usando el intercambio H-D y el ensayo de espectroscopia de masas (H/DXMS) para cartografiar, se determina qué aminoácidos entre 80 y 89 [ADGNVDYHMN (SEC ID N°: 275) o IL-17 humana (SEC ID N°: 1) están comprendidos dentro del epítipo discontinuo al que se unen los anticuerpos de la invención. DGNVDYH (SEC ID N°: 276) es una secuencia esencial comprendida dentro del epítipo discontinuo al que se unen anticuerpos de la invención sobre la base de una comparación de variación de secuencia de IL-17 entre diferentes especies y capacidad de unión. El cambio de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 267 dentro del contexto de la secuencia de IL-17 total, da como resultado la unión no detectable a la IL-17 alterada por parte de un anticuerpo de la invención. Los anticuerpos de la invención no se unen a IL-17 de rata o ratón a niveles superiores al anticuerpo de control.

El ensayo de H/DXMS se usa para identificar regiones de IL-17 a las que se unen anticuerpos de la invención. La tasa de intercambio de hidrógeno de amida es dependiente de la estructura y de la accesibilidad al disolvente del hidrógeno de la amida. La IL-17 libre o el complejo IL-17: anticuerpo en agua se mezcla con agua deuterada (D<sub>2</sub>O) para permitir el intercambio de protones de la amida por deuterio. Esos grupos amida del esqueleto que participan en la unión a proteína se protegen del intercambio y permanecen protonados. Estas regiones se identifican después mediante proteólisis péptica, acoplada con CL y espectroscopia de masas por ionización mediante electropulverización. La IL-17 humana que contiene un etiqueta C-terminal His y Flag (IL-17-Flis) se expresa y purifica a partir de células GS-CHO usando una columna IMAC. Dos partes alícuotas de 10 µg (7,7 µl) de solución de IL-17-Flis se transfieren a 2 Microcon y se añaden 100 µg de bien mAb104 o bien mAb126 (relación molar de IL-17/Mab = 1/2) al Microcon. Se transfieren veinte µg de solución de IL-17-Flis a otro Microcon y no se añade anticuerpo. Después, se añade 1x PBS a cada Microcon a un volumen final de ~180 µl y se centrifuga a 14.000 g durante 14 min. Después se añaden 150 ml de 1x tampón PBS a cada Microcon y se centrifuga a 14.000 g durante 14 min. Estas etapas son necesarias para asegurar que el antígeno libre y el complejo antígeno:anticuerpo se encuentran en condiciones de tamponamiento idénticas.

La porción de proteína se recoge y el volumen final se ajusta a 50 µl (complejo) u 80 µl (IL-17-Flis solo) con 1x PBS. Seis microlitros de IL-17-Flis o complejo de IL-17-Flis y mAb se transfieren a un vial de micro plástico y se añaden 14 µl de D<sub>2</sub>O al 100 % al mismo, dando como resultado un 70 % de D<sub>2</sub>O en la muestra. La solución se incuba a temperatura ambiente durante 10 min. El intercambio se inactiva inmediatamente, se digiere añadiendo 20 µl de solución de ácido fórmico al 1 % y 2 µl de solución 2 mg/ml de pepsina, y se incuba a temperatura ambiente durante 30 segundos o a 0 °C durante 10 min. La digestión se inyecta inmediatamente en una columna manualmente. Se usan Waters 2795 HPLC y Micromass LTC Premier para todos los ensayos. La corriente de HPLC de la bomba de HPLC se conecta a un tubo metálico (aproximadamente 1 ml), a un inyector manual, a una columna Zorbax C18 (2.135 mm) que operan con estos ajustes (temperatura de columna :0 °C; fase móvil C: ácido fórmico al 0,15 % en H<sub>2</sub>O, D: ácido fórmico al 0,12 % en ACN; tiempo de ejecución:23 min). La columna se equilibra con el 98 % de A (solución acuosa de ácido fórmico al 0,15 %) y el 2 % de B (ácido fórmico al 0,12 % en acetonitrilo) a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min. Se realiza un gradiente de elución del 2 % al 10 % de B durante 0,5 min, después al 40 % de

B durante 14,5 min, después al 90 % de B durante 1 min y se mantiene 2 min, y después se vuelve al 2 % de B en 1 min). La muestra de HPLC se analiza mediante espectrometría de masas realizada con estos ajustes (modo ion: positivo; intervalo de escaneo de masas: 300-2000; cono de voltaje de la muestra: 80; flujo de gas de desolvatación (l/h):700; temperatura de desolvatación: 300 °C). El tubo metálico, el bucle inyector y la columna se sumergen en agua helada a lo largo del ensayo. El espectro de masas de cada péptido péptico de IL-17 se obtiene después del intercambio H/D con o sin un mAb anti-IL-17 analizado. Para péptidos pequeños, la masa promedio de cada péptido se calcula sobre la base de sus iones isotópicos e intensidades. Para péptidos grandes, las masas promedio se obtienen a partir de espectros de masas desconvulados después de calibración interna.

Cuando el anticuerpo forma un complejo con la IL-17, la región de unión (epítoto) de IL-17 se protege del disolvente. Esto da como resultado unas velocidades de intercambio de hidrógeno de amida más lentas en comparación con la IL-17 sola. Comparando la masa de péptidos a partir de la forma libre y de complejo después del intercambio por deuterio, los péptidos protegidos mediante formación de complejo deberían ser diferentes de los péptidos correspondientes en la IL-17 libre. La tabla 7 más adelante enumera diferencias de masa que se obtienen por H/DXMS para péptidos pépticos de IL-17. Estos péptidos pépticos cubren la secuencia completa de IL-17-Flis. Tal como demuestran los datos de la tabla, la diferencia de masa de péptido IL-17-Flis entre el complejo y el mismo es similar para ambos anticuerpos analizados, es decir, se unen al mismo epítoto. Se encuentra una diferencia de masa mayor para el péptido péptico 24-87+117-133 (es decir, aminácidos 24 a 87 y 117 a 133 de IL-17) (estos dos péptidos están conectados mediante un enlace disulfuro) y 6-87+117-134, lo que sugiere que restos de estas regiones están implicados en la unión. Debido a que esos péptidos pépticos son bastante grandes, son necesarias otras digestiones enzimáticas para reducir los restos de aminoácidos específicos implicados en la unión. Además de estos datos, los anticuerpos de la invención no se unen a otro miembro de la familia IL-17 (IL-17 B, C, D, E y F) y tampoco se unen a IL-17 de ratón o de rata. Estos datos sugieren conjuntamente con la comparación y examen de secuencia del modelo estructural de homología de IL-17 que los restos 80-89 están comprendidos en un epítoto no lineal de IL-17 al que se unen los anticuerpos de la invención.

Tabla 7

Péptido péptico	IL-17-Flis +mAb 104		IL-17-Flis+ mAb 126	
	Prom (n=3)	DT	Prom (n=3)	DT
1-23+98-116	-0,36	0,61	-0,78	0,59
24-43	-0,79	0,13	-0,44	0,65
27-42	-0,56	0,17	-0,56	0,38
24-65	-1,32	0,54	-1,17	0,19
54 to 65	-0,17	0,37	-0,53	0,25
24-87+117-133	-3,60	0,38	-4,09	0,29
66-87+117-134*	-1,94		-2,38	
88-97	-0,30	0,08	-0,29	0,14
111-116	-0,08	0,07	-0,17	0,08
135-151	-0,14	0,03	-0,12	0,12

**Nota:** la variación de masa (delta masa) se obtiene mediante sustracción de la masa promedio de un péptido péptico de IL-17-Flis solo de la masa promedio del péptido correspondiente del complejo de IL-17-Flis y el anticuerpo.  
\*Este dato es de una digestión de 10 min a 0 °C (n=1). Todos los demás son de digestión ambiente durante 0,5 min.

**Ejemplo 9 Expresión de IL-17 en tejidos cancerosos**

Se analizan diversos lisados de células no cancerosas y cancerosas humanas para determinar la presencia de proteína IL-17. Los tejidos (aproximadamente 50-100 mg por pieza) se congelan instantáneamente sobre hielo seco, ses descongelan sobre hielo y se lisan en 350 µl de tampón TPER (Pierce N° ref:78510) incluidos inhibidores de proteasas (Pierce N° ref:78410) e inhibidores de fosfatasa en tubos que contienen perlas de lisis cerámicas (Qbiogene N° ref:6913-050; perlas cerámicas de 1,4 mm en tubos de 2,0 ml). Los tubos se disponen sobre hielo durante 5-10 min y después se centrifugan a 13.000 x gravedad durante 10 min a 4 °C y el material se transfiere a tubos nuevos para eliminar los desechos. Se vuelven a centrifugar tal como se describe y se transfieren a tubos nuevos. La concentración de proteína se determina usando un procedimiento en BSA estándar. Las muestras se analizan después para determinar la IL-17 usando un kit de ELISA IL-17 comercial según las instrucciones del fabricante (R&D N° ref:DY317 usando tampón de lavado, solución de sustrato y solución de detención de BioFX Labs). Los niveles de IL-17 se normalizan a la concentración de proteínas total. Los niveles de IL-17 aumentan entre dos y tres veces en tejidos de colon cancerosos (60 muestras analizadas) en comparación con tejido de colon normal (63 muestras analizadas). Los niveles de IL-17 aumentan de media entre tres y cuatro veces en tejidos de riñón cancerosos (21 muestras analizadas) en comparación con tejido de riñón normal (21 muestras analizadas). Los niveles de IL-17 en tejido de próstata canceroso (44 muestras analizadas) aumentan en comparación con el tejido de próstata normal (7 muestras analizadas). Los niveles de IL-17 no se elevaron en otros tipos de tejido tumoral analizados, incluido de mama, cuello, pulmón, laringe, tiroides, lengua, ovario y cerebro.

**Ejemplo 10 Activación de IL-17 de células microgliales**

La IL-17 induce a una línea celular de microglía de cerebro murina (BV-2) a segregar IFN y p70 de IL-12. La línea celular microglial murina BV-2 [obtenida de Scios, con permiso de Elisabeta Blasi (Universidad de Microbiología de Perugia, Italia) que las aisló originariamente (E. Blasi y col., J. Immunology 1990, 27:229-237)] se cultivan en recipientes de cultivo tisular recubiertos con poli-D-lisina, a una confluencia no superior al 60 % en DMEM con alta concentración de glucosa (Invitrogen N° ref:31053-028) con L-glutamina 2 mM (Invitrogen/GIBCO N° ref:25030-081), FBS al 10 % (inactivada mediante calentamiento; Invitrogen/GIBCO N° ref:10082-147), piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen/GIBCO N° ref:11360-070), 100 µg/ml de Normocina (InvivoGen) a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.

El día 0 del ensayo, las células BV-2 se enjuagan (PBS de Dulbecco con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>; Invitrogen), se retiran (tripsina al 0,25 % + EDTA) seguido por la inactivación con tripsina y después se centrifugan (500X g 5 min a TA). La pella de células resultante se resuspende a una densidad de células de ~7.000 células/100 µl de medio de cultivo. Se dispensan 100 µl de suspensión de células en 60 pocillos interiores separados de placas de 96 pocillo tratadas con cultivo tisular recubiertas con poli-D-lisina. Las placas se incuban tal como se describe durante aproximadamente 48 horas antes del tratamiento con IL-17.

El día 2 del ensayo, se diluye IL-17 de ratón recombinante (IL-17r) (exento de vehículo; R&D Systems); reconstituido en PBS de Dulbecco sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> en una placa de polipropileno a 1,5 µg/ml (la concentración de ensayo más elevada) en medio de cultivo. La IL-17 de ratón se diluye serialmente posteriormente en la placa de polipropileno. Un control positivo es LPS diluido en medio de cultivo a 1 µg/ml (la concentración de ensayo más elevada). El medio de ensayo se usa como control negativo. El medio se aspira cuidadosamente de las células, antes de añadir tratamientos (150 µl/pocillo). El análisis se realiza por triplicado (3 pocillos por tratamiento). Se incuban placas replicadas aparte durante bien 24 h o bien 48 h a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %.

Los días 3 y 4 del ensayo, las placas se centrifugan (500X g durante 5 min a TA), después el medio de cultivo celular se transfiere a placas de 96 pocillos de polipropileno, que están selladas y congeladas (-80 °C). Las muestras de medio se descongelan y se analizan para determinar los niveles de citocina y quimiocina con un kit multiplex 22-plex (Linco), según las instrucciones del fabricante (excepto: una placa de filtro de policarbonato con las paredes negras (Millipore) reemplaza a la placa de filtro incluida en el kit). La fluorescencia se lee en un instrumento Luminex® (50 perlas por cada conjunto de perlas, ajuste de ganancia de RP1 bajo). Los datos se muestran más adelante en la tabla 8.

Se obtienen curvas estándar usando un ajuste logístico de cuatro o cinco parámetros. Los valores de IFNγ y IL-12p70 (pg/ml) se determinan a partir de las curvas estándar usando técnicas estadísticas estándar.

Tabla 8

24 después del tratamiento con IL-17		
Conc. de IL-17m, µg/ml	IFNγ PROM., pg/ml	IL-12p70 PROM., pg/ml
1,5	125,87	65,58
0,375	123,89	59,63
0,0938	125,61	67,87
0,0059	58,91	38,12
0,0015	18,78	12,34
control solo medio	por debajo del límite de detección	por debajo del límite de detección
LPS, 1 µg/ml	5,11	51,11
LPS, 0,25 µg/ml	5,07	49,00
48 después del tratamiento con IL-17		
Conc. de IL-17m, µg/ml	IFNγ PROM., pg/ml	IL-12p70 PROM., pg/ml
1,5	134,38	61,48
0,375	124,99	58,65
0,0938	119,96	58,15
0,0059	47,07	27,87
0,0015	13,97	9,44
control solo medio	por debajo del límite de detección	por debajo del límite de detección
LPS, 1 µg/ml	5,20	46,37
LPS, 0,25 µg/ml	4,30	36,36

**Ejemplo 11 Modelo de inducción de DSS de trastorno del intestino irritable**

El IBD es una enfermedad inflamatoria crónica que incluye la enfermedad de Crohny colitis ulcerativa. Los niveles de proteína IL-17 son significativamente elevados en los sueros y en los tejidos de colon de pacientes con colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn. No obstante, la IL-17 no es detectable en los sueros de individuos normales, o de

pacientes con colitis infecciosa o colitis isquémica. El modelo de DSS (sulfato de dextrano y sodio) es uno de los modelos preclínicos más antiguos y representativos para la enfermedad del intestino irritable (IBD). En el modelo de DSS (véase, por ejemplo, FASEB Journal. 2004;18:1550-1552) se inducen tanto lesiones inflamatorias agudas como crónicas. Los ratones tienen un alto grado de uniformidad de las lesiones con pérdida de peso corporal y longitud de colon. Es reproducible con respecto al transcurso del tiempo y la gravedad entre ratones individuales. Para inducir la enfermedad, los ratones reciben DSS al 5 % de 30-40 Kd en agua de bebida durante 7 días. El índice de actividad de la enfermedad (DAI) que incluye hemocult positivo o sangrado rectal, deposiciones blandas y pérdida de peso corporal (5-8 %) se observa a aproximadamente el día 8. Se realiza un seguimiento del peso corporal de los ratones cada día durante 2 semanas. Los ratones se sacrifican de aproximadamente el día 12 a aproximadamente el día 15. La proteína IL-17 está aumentada significativamente en colon tratado con DSS en comparación con colon sin tratamiento previo. El tratamiento con anticuerpo IL-17 puede reducir el índice de actividad de la enfermedad.

### Ejemplo 12 Modelo EAE para esclerosis múltiple

La EAE es una enfermedad desmielinante mediada por linfocitos T CD4+ del sistema nervioso central (SNC) que sirve como modelo para EM en seres humanos. Los mecanismos patógenos del desarrollo de EAE incluyen activación de linfocitos T específicos del antígeno y diferenciación de Th1 seguido por infiltración de macrófagos en el SNC. La IL-17 contribuye a la patología de la esclerosis múltiple (EM). Los análisis de microselección de lesiones de EM en pacientes humanos demostraron un aumento de IL-17 (Lock y col. Nat. Med. 8:500-508, 2002). Las células mononucleares (MNC) que expresan ARNm de IL-17 en sangre y fluido cerebroespinal están significativamente elevados en un número de pacientes con EM y se detectaron niveles más altos de MNC que expresa ARNm de IL-17 durante la exacerbación clínica de EM en comparación con al remisión (Matusevicius y col. Multiple Sclerosis. 5:1-1-104, 1999). La EAE se suprime significativamente en ratones con IL-17 inactivada (Nakae y col., J. Immun. 171:6173-6177).

El ejemplo descrito en el presente documento demuestra que la proteína IL-17 aumenta en la médula espinal de ratones con EAE y el tratamiento con un anticuerpo IL-17 antimurino reduce los registros de EAE en el modelo de EAE activo. Para la inducción de la enfermedad, se inmunizaron subcutáneamente ratones C57BL/6 hembra de 8-9 semanas de edad el día 0 con bien (i) 200 µl de 5 mg/ml de toxina pertussis (PT) y coadyuvante de Freund completo (CFA) o bien (ii) PT, CFA y 300 µg/200 µl de MOG35-55 (glucoproteína de oligodendrocito de mielina emulsionada en CFA que contiene 5 mg/ml de Mycobacterium tuberculosis inactivado mediante calor). El día 2, los ratones se tratan de nuevo con PT. Los ratones se registran a lo largo del estudio para determinar niveles de parálisis. Se espera la enfermedad en el grupo que recibe MOG. Un anticuerpo IgG<sub>1</sub> monoclonal IL-17 anti-murino o anticuerpo de control isotópico se administra a ratones los días 1, 7 y 15 (BD Biosciences para anticuerpo IL-17 anti-murino de rata). Los ratones que recibieron MOG se sacrificaron cuando se alcanzaron registros clínicos entre 1-3 (en una escala de 0-4); esto es entre los días 14-31 para el estudio 1 en la tabla 9 más adelante y entre los días 14-16 para el estudio 2 en la tabla 10 más adelante. Los signos clínicos de la enfermedad se desarrollan aproximadamente el día 10. Los animales individuales se registran subjetivamente mediante al menos 2 registros independientemente y se ciegan a la identidad de grupos de tratamiento según la gravedad de la enfermedad del SNC clínica. El grado 0 es normal; el grado 1 es un rabo completamente mustio; el grado 2 es debilidad de las extremidades posteriores parcial unilateral; el grado 3 es parálisis total de las extremidades posteriores y el grado 4 es que el ratón está moribundo. (véase J. Exp. Med. 194: 873-881, 2001). Se sacrifica un ratón de control el mismo día que los ratones tratados con MOG. Las médulas espinales se aíslan en el momento del sacrificio y se congelan instantáneamente para usarlas para el análisis de proteína IL-17 por ELISA. El grupo de tratamiento de anticuerpo IL-17 tiene registros de la enfermedad significativamente inferiores en comparación con el grupo de control isotópico.

Se preparan lisados de cada médula espinal completa en 1 ml (estudio 1 en la tabla 9 más adelante) o 0,4 ml (estudio 2 en la tabla 7 más adelante) de reactivo de extracción de proteína TPER (Pierce N° ref:78510) con inhibidores de proteasa completos (Roche Applied Science N° ref:11697498), en tubos de 2 ml que contienen perlas cerámicas (matriz de lisis D, QBiogene N° ref:6913050), e instrumento FastPrep (Bio101) durante 30 segundos a una escala de 5,5. Después de la lisis, las muestras se centrifugan (5 min a 14.000 rpm en un microcentrifugador) para eliminar desechos. Los sobrenadantes se transfieren a tubos de microcentrifugador nuevos. La concentración total de proteína en cada lisado se determina con el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce N° ref:23225), usando el protocolo de microplaca del fabricante. Los lisados se congelan y se almacenan a -80 °C.

Después de descongelar los lisados sobre hielo y aclararlos por centrifugación, los niveles de IL-17 de ratón se miden en muestras no diluidas por ELISA (R&D Quantikine N° ref:M1700) según las instrucciones del fabricante. Se obtienen curvas estándar usando un ajuste logístico de cuatro parámetros. Los valores de IL-17 se determinan a partir de las curvas estándar usando técnicas estadísticas estándar. Los niveles de IL-17 se normalizan a la concentración de proteína en cada muestra y se expresan como pg de IL-17/ml en cada lisado en las tablas 9 y 10 más adelante. Tal como se demuestra por los datos de las tablas, se detectaron niveles aumentados de IL-17 en ratones con EAE.

60

Tabla 9

ESTUDIO 1				
GRUPO	INTERVALO DE VALORES DE IL-17M, pg/mg	IL-17M PROM., pg/mg (+/- SE)	INTERVALO DE REGISTROS CLÍNICOS EN EL SACRIFICIO	REGISTROS CLÍNICOS PROM. EN EL SACRIFICIO (+/- ET)
Sin tratamiento (n=7)	3,63 - 10,06	5,19 +/- 0,87	N/A	N/A
CFA (n=14)	3,16-7,51	4,31 +/- 0,33	N/A	N/A
CFA+MOG (n=14)	4,12 - 16,62	8,57 +/- 1,01	0,9 - 3,0	1,74 +/- 0,20
Todos los valores de ELISA de IL-17 estuvieron dentro del intervalo de detección del ELISA, promedio de ensayos por duplicado				

Tabla 10

ESTUDIO 2				
GRUPO	INTERVALO DE VALORES DE IL-17M, pg/mg	IL-17M PROM., pg/mg (+/- SE)	INTERVALO DE REGISTROS CLÍNICOS EN EL SACRIFICIO	REGISTROS CLÍNICOS PROM. EN EL SACRIFICIO (+/- ET)
CFA (n=6)	1,88 - 2,78	2,24 +/- 0,14	N/A	N/A
CFA+MOG (n=8)	1,78 - 5,42	3,34 +/- 0,45	2,75 - 3,20	2,94 +/- 0,06
Todos los valores de ELISA de IL-17 estuvieron dentro del intervalo de detección del ELISA, promedio de ensayos por duplicado				

### 5 Ejemplo 13 Modelo de artritis inducida por colágeno

La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de roedor usado ampliamente para artritis reumatoide ("AR") y tiene características histopatológicas en común con AR humana. La artritis experimental inducida en ratones DBA/1 mediante inmunización y refuerzo con emulsiones de colágeno de tipo II, es una enfermedad poliarticular caracterizada por la inflamación de articulaciones y erosión progresiva del cartílago y el hueso (Trentham D y col., J. Exp. Med. 146:857-858, 1977). Recientemente, Lubberts y col., (Arthritis & Rheumatism, 50:650-659, 2004; incorporado al presente documento) demostraron que el anticuerpo IL-17 anti-murino de conejo policlonal, administrado bien en el momento de aparición o en un estadio más tardío de CIA murina, mejora los signos clínicos de la artritis.

En el modelo CIA, los ratones a los que se administró una única inyección de mAb de IgG2a de IL-17 anti-murino de rata intraperitonealmente (8 mg/kg R&D, clon 50104.11 de MAB421) muestran registros clínicos significativamente más bajos que los ratones a los que se inyectó 16 mg/kg de IgG2a de rata de control. El reactante de fase aguda, la proteína C-reactiva (CRP), es un índice aceptado de la actividad de la enfermedad en pacientes con AR. De forma similar al CRP, la proteína amiloidide en suero murina (SAP) sirve como indicador de la enfermedad en el modelo de CIA murina (Bliven, M. y col., Arthritis & Rheumatism, 29:1131-1138, 1986). En animales tratados con 8 mg/kg de IL-17 anti-murino los niveles de SAP fueron significativamente inferiores a los encontrados en los tratados con anticuerpo de control. Además, la disminución de registros clínicos y valores de SAP son comparables a un grupo de IL-1 $\beta$  anti-ratón (8 mg/kg) usado como control positivo. Finalmente, la reducción significativa en inflamación sinovial a 8 mg/kg de anticuerpo y la reabsorción ósea a 16 mg/kg de anticuerpo está presente en comparación con la de ratones tratados con anticuerpo de control. Puede realizarse un estudio de respuesta a la dosis en el modelo CIA con anticuerpo IL-17 antimurino (por ejemplo, a 0,1, 1 y 8 mg/kg). Los registros clínicos para IL-17 anti-murino de rata representan una tendencia para una respuesta a la dosis. Se puede realizar un ensayo similar en monos cynomolgus como modelo para AR usando un anticuerpo de la invención.

### Ejemplo 14 Purificación de mAb anti-IL-17

Un vector que expresa un mAb de la invención se incorpora de forma estable a una célula huésped apropiada, (por ejemplo, células CHO DG44 (dhfr-) (Chasin) o células NSO) usando procedimientos estándar y se purifican usando una columna de afinidad de Proteína A. Brevemente, se aplica medio acondicionado clarificado a una columna FF de sefarosa de 5 ml HiTrap rProtein A (Amersham Biosciences) que se ha equilibrado con PBS (pH 7,4). La columna se lava con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibración a una velocidad de flujo de 110 cm/h para retirar mediante lavado componentes de unión no específicos. El anticuerpo de unión se eluye usando un gradiente de pH lineal (tampón de fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,8, a tampón de citrato de sodio 0,1 M, pH 2,5). El pico de proteína principal en la elución se recoge y su pH se ajusta para neutralizar con tampón de Tris 1 M (pH 8,5). La proteína reunida se concentra a 1-2 mg/ml usando membrana Vivaspina 10K (Vivasciences) y se filtra de forma estéril (0,45  $\mu$ m) antes de almacenamiento a 4 °C.

Para preparaciones grandes de un mAb de la invención, el concentrado exento de células se purifica mediante tres columnas cromatográficas secuenciales (proteína A, intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrófoba). La pureza del mAb después de estas etapas cromatográficas es superior al 99 % tal como se evalúa mediante cromatografía de exclusión por tamaño analítica. El mAb se intercambia en un tampón tal como se enumera más adelante dependiendo de la concentración del anticuerpo. Los resultados de estabilidad química indican un pH entre 6,0 y 7,0 (incluidos); aunque para preparaciones de 20 mg/ml, el pH puede encontrarse entre 5,5 y 7,0 (incluidos, por ejemplo, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0). Para el producto liofilizado es preferentes un nivel de cloruro sódico de 90-30 mM (90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35 ó 30 mM o cualquier valor entre 30 y 90 mM), mientras que para una formulación líquida (por ejemplo, para administrar subcutáneamente) es preferente un nivel de cloruro de sodio de 100 - 150 mM (100, 110, 120, 130, 140 ó 150 mM o cualquier valor entre 100 y 150 mM). El producto se concentra después a una concentración final de aproximadamente 10, 20 ó 25 mg/ml (alternativamente superior, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 mg/ml o superior) y se filtra de forma estéril. El producto filtrado puede congelarse inmediatamente a -70 °C o puede liofilizarse. Es necesaria una relación en peso mínima de 1:2 para el anticuerpo con respecto al lioprotector (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) para lograr una formulación liofilizada estable pero no se requiere para una formulación química. Adicionalmente, se añade tensioactivo al 0,02 % (p/v), es decir, polisorbato-80, a ambas formulaciones en solución y las soluciones se liofilizan. El material liofilizado se resuspende en agua estéril para inyección o cloruro de sodio al 0,9 % estéril antes de la administración.

Tabla 11

Conc. de mAb	Tampón	pH	NaCl (mM)
10 mg/ml	citrato 10 mM(Na)	6,0	30, 50-150
20 mg/ml	citrato 10 mM	5,5	50-150
20 mg/ml	citrato 10 mM	6,0	50-150
20 mg/ml	citrato 10 mM	6,5	50-150
20 mg/ml	citrato 10 mM	7,0	50-150
20 mg/ml	histidina 10 mM	6,5	150
>50 mg/ml	citrato 10 mM	5,5	50-150
>50 mg/ml	citrato 10 mM	6,0	50-150
>50 mg/ml	citrato 10 mM	6,5	50-150
>50 mg/ml	histidina 10 mM	6,5	150

#### Ejemplo 15 Semivida del anticuerpo *in vivo*

La farmacocinética en suero de anticuerpos de la invención (por ejemplo, mAb 126 y 121 [región Fc de IgG4 con Fab 126 ó 121 respectivamente]) se determinan después de la administración intravenosa o subcutánea en monos cynomolgus macho. Las concentraciones de los anticuerpos en el suero se determinan usando un ensayo ELISA de captura de antígeno estándar en el cual se recubren placas con IL-17 humana y se detecta el anticuerpo en suero usando un anticuerpo secundario anti-IgG<sub>4</sub>. Siguiendo la administración intravenosa de 1 mg/kg, se elimina mAb 126 con una semivida media de 6,5 días y se elimina mAb 121 con una semivida media de aproximadamente 11 días. Siguiendo a la administración subcutánea de 1 mg/kg, el mAb 126 tiene una semivida de eliminación media de 10,3 días y el mAb 121 tiene una semivida de eliminación media de 13 días.

#### Ejemplo 16 Modelo de xenoinjerto tumoral

Para establecer modelos de xenoinjerto tumoral con el que analizar la actividad antitumoral de anticuerpos anti-IL-17 de la invención, se mezclan 5 millones de células de carcinoma colorrectal HCT116 con Matrigel y se inyectan en el costado derecho de ratones atímicos hembra de 56 semanas de edad (nu/nu) (laboratorios Charles River, Wilmington, MA, Estados Unidos). Los ratones se tartan mediante inyección subcutánea cada 7 días con anticuerpos de control (por ejemplo, IgG4 humana e IgG1 de ratón), 4 mg/kg de IL-17 anti-humana, 8 mg/kg de IL-17 anti-ratón o una combinación de 4 mg/kg de IL-17 anti-humana y 8 mg/kg de IL-17 anti-ratón durante 4 semanas. La primera administración del anticuerpo comienza un día antes del implante de células. Los tumores se miden dos veces cada semana con un calibrador y se realiza un seguimiento del peso corporal dos veces a la semana. Se recoge plasma de cada ratón el día 34 y se miden los niveles de KC usando un kit de ELISA de KC según las instrucciones del fabricante (R&D System). En comparación con ratones inyectados con IgG control, los ratones tratados con la combinación de anticuerpo IL-17 anti-humana y anticuerpo IL-17 anti-ratón han reducido significativamente el volumen del tumor. Además, los ratones tratados tanto con anticuerpo IL-17 anti-humano como con anticuerpo IL-17 anti-ratón han reducido dramáticamente el KC en plasma. Los ratones tratados con bien 4 mg/kg de IL-17 anti-humana o bien 8 mg/kg de IL-17 anti-ratón no revelaron ninguna reducción significativa del volumen del tumor y de niveles de KC en plasma. Los datos se muestran en las tablas 12 y 13 del presente documento.

Para medir el nivel de IL17 en los tumores, los tumores de modelos de xenoinjerto de ratón se preparan extensamente tal como se describe en el ejemplo 9. Para la medición de proteínas, los lisados tumorales se diluyen 1:10 en TPER + 1X Halt en una placa de dilución de 96 pocillos de polipropileno. La concentración de proteína se determina usando el protocolo de microplaca del Ensayo de proteína Coomassie Plus (Pierce N° ref:23236). Se

diluye BSA estándar en TPER + Halt. Los niveles de proteína IL-17 se determinan usando el kit de ELISA IL-17 de R&D System siguiendo las instrucciones del fabricante (ELISAI DuoSet de IL-17 humana, R+D Systems, Cat. N° ref: DY317; ELISA IL-17 de ratón, R+D System, N° de cat. 421). Ambos IL-17, humano y de ratón, aumentaron en tumores de modelos de xenoinjerto tumoral de colon HCT116 y HT29 en comparación con el modelo de xenoinjerto de pulmón H460.

5

Tabla 12 Volumen del tumor

(n = 10)		
Tiempo, días (después de la implantación de células HCT-116)	controles de isotipos de IgG1 de rata + IgG4 humana (MEDIA +/- ET)	IL-17 anti-ratón+ IL-17 anti-humano (MEDIA +/- ET)
8	101,4 +/- 6,7	91,5 +/- 9,4
14	149,2 +/- 9,2	123,9 +/- 16,2
17	162,1 +/- 12,4	134,6 +/- 14,7
20	177,7 +/- 17,1	152,8 +/- 18,7
24	279,2 +/- 22,8	222,4 +/- 35,4
28	323,3 +/- 22,5	244,6 +/- 32,8
31	405,8 +/- 33,4	275,1 +/- 36,6
34	537,7 +/- 50,7	339,8 +/- 46,3
El volumen del tumor se calcula usando el procedimiento de LogVol.AR		

Tabla 13: Nivel de quimiocinas en plasma 35 días después del implante

(n = 10)		
GRUPO	INTERVALO DE VALORES DE KC, pg/ml	KC PROM., pg/mg (+/- SE)
IgG1 de rata + controles de isotipos de IgG4 humana	76,3 – 168,4	112,5 +/- 10,0
IL-17 anti-ratón + IL-17 anti-humana	55,6 – 110,5	84,7 +/- 5,7
PORCENTAJE DE DIFERENCIA DE KC PROM. (grupo anti-IL-17 comparado con grupo control de isotipos): -24,7 %		

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 humanizado, comprendiendo dicho anticuerpo:
- a) un péptido con SEC ID N°: 131 en CDRL1,
  - b) un péptido con SEC ID N°: 167 en CDRL2,
  - 5 c) un péptido con SEC ID N°: 168 en CDRL3,
  - d) un péptido con SEC ID N°: 26 en CDRH1,
  - e) un péptido con SEC ID N°: 30 en CDRH2,
  - f) un péptido con SEC ID N°: 52 en CDRH3.
- 10 2. Un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 humanizado según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una LCVR con SEC ID N°: 241 y una HCVR con SEC ID N°: 118.
3. Un anticuerpo humanizado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, un anticuerpo sustancialmente intacto, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub> o un fragmento Fv monocatenario.
- 15 4. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicación 1 a 3, en el que el anticuerpo comprende además una región constante de cadena pesada seleccionada entre IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA, IgE, IgM e IgD.
5. Una composición que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso como medicamento.
- 20 7. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento de una o varias afecciones seleccionadas entre artritis reumatoide, trastorno inflamatorio intestinal, psoriasis y esclerosis múltiple.

Figura 1 Familia IL-17 humana

	1			40
IL-17	MTPGKTSLSV	LLLLLSLEAI	VKAGITIPR-	NPGCPNSEDK
IL-17B	----MDWPHN	LLFLLTISIF	LGLG1P4WP-	KWKRKGQGRP
IL-17C	----MTLLPG	LLFLTWLHTC	LAHHDPSLRG	HPHSHGTPHC
IL-17D	-----MLV	AGFLLALPPS	WAAGAPRAGR	RPARPRGCAD
IL-17E	MRERPRLGED	SSLISLFLQV	VAFLAMVMGT	HTYSHWPSCC
IL-17F	--MVKYLLLS	ILGLAFLSEA	AARKIPKVG-	HTFFQKPESC
	41			80
IL-17	NFPRTVMVNL	NIHNRNTNTN	P-----	-----
IL-17B	GPLAPGPHQV	PLDLVSRMKP	YARMEEYERN	IEEMVAQLRN
IL-17C	YSAEELPLQA	PPHLIARGAK	WGOALPVALV	SSLEAASHRG
IL-17D	RPERLLEQLY	GRLAAGVLSA	FHHTLQLGPR	EQARNASCPA
IL-17E	PSKGQDTSEE	LLRWSTVPVP	PLEPARPNRH	PESCRAS---
IL-17F				
	81		* * ** * 120	
IL-17	-----	-----KR	SSDYNRSTS	PWNLHRNEDP
IL-17B	SSELAQRKCE	VN-----LQ	LWMSNKRSL	PWGYSINHDP
IL-17C	RHERPSATTQ	CPVLRPEEVL	EADTHQRSIS	PWRYRVDTDE
IL-17D	GGRPADR---	-----RF	RPPTNLRSVS	PWAYRISYDP
IL-17E	-----	-----E	DGPLNSRAIS	PWRYELDRDL
IL-17F	-----	-----SM	SRNIESRSTS	PWNYTVTWDP
	121	* *		*
IL-17	ERYPSVIWEA	KCRHLGCINA	D--GNVDYHM	NSVPIQQEIL
IL-17B	SRIPVDLPEA	RCLCLGCVNP	FT-MWEDRSM	VSVPVFSQVP
IL-17C	DRYPQKLafa	ECLCRGCIDA	RT-GRETAAL	NSVRLQLSLL
IL-17D	ARYPRYLPEA	YCLCRGCLTG	LF-GEEDVRF	RSAPVYMPTV
IL-17E	NRLPQDLYHA	RCLCPHCVSL	QTGSHMDPRG	NSELLYHNQT
IL-17F	NRYPSEVVQA	QCRNLGCINA	Q--GKEDISM	NSVPIQQETL
	161			200
	* *			* *
IL-17	VLRREPPHCP	NS-----	-FRLEKILVS	VGCTCVTPIV
IL-17B	VRRRLCPPPP	RTG-----PC	RQRAVMETIA	VGCTCIF---
IL-17C	VLRRRPCSrd	GSGLPTPGAF	AFHTEFIHVP	VGCTCVLPRS
IL-17D	VLRRTPACAG	GRS-----	VYTEAYVTIP	VGCTCVPEPE
IL-17E	VFYRRPCHGE	KGTHKG---Y	CLEFFLYRVS	LACVCVRPRV
IL-17F	VVRRKHQGCS	VS-----	-FQLEKVLVT	VGCTCVTPVI
	201		228	
IL-17	HHVA-----	-----	-----	(SEC ID Nº 1)
IL-17B	-----	-----	-----	(SEC ID Nº 2)
IL-17C	V-----	-----	-----	(SEC ID Nº 3)
IL-17D	KDADSINSSI	DKQGAKLLLG	PNDAPAGP	(SEC ID Nº 4)
IL-17E	MG-----	-----	-----	(SEC ID Nº 5)
IL-17F	HHVQ-----	-----	-----	(SEC ID Nº 6)

Figura 2

IL-17

ratón rata conejo humano mono	* * * * * MSPGRASSVSLMLLLLLSLAATVKAALIPQSSACPNTAKDFLQNVKVNKLVFNLSLGAK MSPRRIPSMCLMLLLLLLNLEATVKAAVLIPOSSVCPNAEANNFLQNVKVNKLVINSLSK MSLGRISVSLSL--LLLLCLVATVKNGIAMPRNPGCPNAEDKNFPQNVKVSINILNK---S MTPGKTSLSVSL--LLLLSLEAIVKAGITIPRNPGPCNSEDKNFPRTVMVNLNIHNR-NTN MTPGKTSLSVSL--LLLLSLEAIVKAGIAIPRNSGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNR-NTS	
ratón rata conejo humano mono	* * * * * VSSRRPSDYLNIRSTSPWTLHRNEDPDYPSVIWEAQCRHQRVCVNAEGKLDHMHNSVLIQQ ASSRRPSDYLNIRSTSPWTLHRNEDPDYPSVIWEAQCRHQRVCVNAEGKLDHMHNSVLIQQ VNSRRPSDYLNIRSTSPWTLHRNEDRERYPSVIWEAKCRHLGCVNAEGNEDHMHNSVPIQQ TNPKRSSDYLNIRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCVNADGNVDYHMNSVPIQQ TNPKRSSDYLNIRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCVKADGNVDYHMNSVPIQQ	
ratón rata conejo humano mono	* * * * * EILVLKREPESCPTFRVEKMLVGVGCTCVASIVRQAA- (SEC ID N° 1) EILVLKREPEKCPFTFRVEKMLVGVGCTCVSSIVRHAS- (SEC ID N° 2) EILVLRRESQHCPSFRLEKMLVAVGCTCVTPIIHMAX (SEC ID N° 3) EILVLRREPPHCPSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA- (SEC ID N° 4) EILVLRREPRHCPSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVAX (SEC ID N° 5)	