

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 669**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2005 E 05803526 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1814915**

54 Título: **Anticuerpos neutralizantes con especificidad para IL-17 humana**

30 Prioridad:

19.11.2004 GB 0425569

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

23.04.2014

73 Titular/es:

**UCB PHARMA S.A. (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE**

72 Inventor/es:

**ADAMS, RALPH;
POPPLEWELL, ANDREW GEORGE;
RAPECKI, STEPHEN EDWARD y
TICKLE, SIMON PETER**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 456 669 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 neutralizantes con especificidad para IL-17 humana.

La presente invención se refiere a una molécula de anticuerpo que tiene especificidad para determinantes antigénicos de IL-17. La presente invención también se refiere a los usos terapéuticos de la molécula de anticuerpo y métodos para producir la molécula de anticuerpo.

La interleucina 17 (IL-17), también conocida como CTLA-8 o IL-17A, es una citocina proinflamatoria que estimula la secreción de una amplia variedad de otras citocinas a partir de diversas células no inmunitarias. IL-17 puede inducir la secreción de IL-6, IL-8, PGE2, MCP-1 y G-CSF por células adherentes como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales y endoteliales y también puede inducir expresión superficial de ICAM-1, proliferación de células T y crecimiento y diferenciación de progenitores humanos CD34+ en neutrófilos cuando se cultivan de manera conjunta en presencia de fibroblastos irradiados (Fossiez *et al.*, 1.998, Int. Rev. Immunol. 16, 541-551). IL-17 se produce de manera predominante por células T de memoria activadas y actúa por unión a un receptor de superficie de células distribuidas de manera ubicua (IL-17R) (Yao *et al.*, 1.997, Cytokine, 9, 794-800). Se ha identificado una serie de homólogos de IL-17 que tienen funciones tanto similares como distintas en la regulación de respuestas inflamatorias. Para una revisión de las familias de citocina IL-17/receptor véase Dumont, 2.003, Expert Opin. Ther. Patents, 13, 287-303.

IL-17 puede contribuir a una serie de enfermedades mediadas por respuestas inmunitarias anormales, tales como artritis reumatoide e inflamaciones de las vías respiratorias, así como rechazo de trasplante de órganos e inmunidad antitumoral. Los inhibidores de actividad de IL-17 son conocidos en la técnica, por ejemplo una IL-17R de murina: proteína de fusión Fc humana, se ha usado una IL-17R soluble de murina y un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 para demostrar la función de IL-17 en diversos modelos de artritis reumatoide (Lubberts *et al.*, J. Immunol. 2.001,167, 1.004-1.013; Chabaud *et al.*, Arthritis Res. 2.001, 3, 168-177). Kotake *et al.* desvelan IL-17 en fluidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide es un estimulador potencial de osteoclastogénesis (Journal of Clinical Investigations, American Society for Clinical Investigations vol. 103, nº 9, 1 de mayo de 1.999). Además, se han usado anticuerpos policlonales neutralizantes para reducir la formación de adhesión peritoneal (Chung *et al.*, 2.002, J. Exp. Med., 195, 1.471-1.478). Los sistemas R&D proporcionan uso para investigación de un anticuerpo monoclonal de IL-17 anti-humano de murina neutralizante (clon 41809 y número de catálogo#MAB317). Hasta la fecha no se han desarrollado anticuerpos de IL-17 anti-humanos para uso en tratamiento y por lo tanto hay necesidad de un anticuerpo de anti-IL-17, de alta afinidad, adecuado para tratar pacientes.

Ahora se ha identificado un anticuerpo de anti-IL-17 neutralizante de alta afinidad que es eficaz en particular *in vivo*, por ejemplo en los modelos de inflamación *in vivo* descritos en la presente memoria.

Así se proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, con una cadena pesada que comprende la secuencia gH11 (SEC ID N°: 11) y una cadena ligera que comprende la secuencia gL3 (SEC ID N°: 13).

En otra realización se proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, con una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 2 y una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4.

En una realización más, se proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, con una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 18.

Los restos en dominios variables de anticuerpos se numeran de manera convencional según un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se explica en Kabat *et al.*, 1.987, in Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (a partir de ahora "Kabat *et al.* (*supra*)"). Este sistema de numeración se usa en la presente memoria descriptiva excepto en el caso de que se indique de otro modo.

Las denominaciones de los restos Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los restos aminoácido. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o adicionales que en la numeración Kabat estricta que corresponde a un acortamiento de, o inserción a, un componente estructural, entramado o región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), de la estructura básica del dominio variable. La correcta numeración Kabat de restos se puede determinar para un anticuerpo determinado por alineación de restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat "clásica".

Las CDR del dominio variable de cadena pesada se sitúan en los restos 31-35 (CDR-H1), los restos 50-65 (CDR-H2) y los restos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A. M. J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1.987)), el bucle equivalente a CDR-H1 se extiende del resto 26 al resto 32. Así 'CDR-H1', como se usa en la presente memoria, comprende los restos 26 a 35, como se describe por una combinación del sistema de numeración Kabat y la definición de bucle topológica de Chothia.

Las CDR del dominio variable de cadena ligera se sitúan en los restos 24-34 (CDR-L1), los restos 50-56 (CDR-L2) y

los restos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración Kabat.

Como se usa en la presente memoria, el término 'anticuerpo neutralizante' describe un anticuerpo que puede neutralizar la actividad de señalización biológica de IL-17, por ejemplo por unión de bloqueo de IL-17 a la IL-17R.

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, que comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una de una CDR con la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 5 para CDR-H1, una CDR con la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 6 para CDR-H2 y una CDR con la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 7 para CDR-H3.

10 Preferiblemente, un anticuerpo del primer aspecto de la presente invención comprende una cadena pesada en la que se seleccionan al menos dos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del dominio variable de la cadena pesada de lo siguiente: la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 5 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 6 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 7 para CDR-H3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 5 y CDR-H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 6. Alternativamente, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 5 y CDR-H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 7 o el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 6 y CDR-H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 7. Para evitar la duda, se entiende que se incluyen todas las modificaciones.

20 Más preferiblemente, el anticuerpo del primer aspecto de la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 5 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 6 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 7 para CDR-H3.

En una realización, el anticuerpo del primer aspecto de la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 2.

25 "Identidad", como se usa en la presente memoria, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", como se usa en la presente memoria, indica que, en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede sustituir isoleucina o valina. Otros aminoácidos que con frecuencia se pueden sustituir mutuamente incluyen pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos con cadenas laterales aromáticas);

30 - lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);

- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);

- asparagina y glutamina (aminoácidos con cadenas laterales amidas) y

35 - cisteína y metionina (aminoácidos con cadenas laterales que contienen azufre). Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1.988; Biocomputing, Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1.993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1.994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1.987 y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1.991).

40 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, que comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de una CDR con la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 8 para CDR-L1, una CDR con la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 9 para CDR-L2 y una CDR con la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 10 para CDR-L3.

45 Preferiblemente, el anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención comprende una cadena ligera, en la que al menos dos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del dominio variable de la cadena ligera se seleccionan de lo siguiente: la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 8 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 9 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 10 para CDR-L3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en la que CDR-L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 8 y CDR-L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 9. Alternativamente, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en la que CDR-L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 8 y CDR-L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 10 o el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en la que CDR-L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 9 y CDR-L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 10. Para evitar la duda, se entiende que se incluyen todas las modificaciones.

Más preferiblemente, el anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención comprende una cadena ligera, en

la que el dominio variable comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 8 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 9 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en la SEC ID N°:10 para CDR-L3.

En una realización, el anticuerpo del segundo aspecto de la presente invención comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4.

5 En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad o similitud que la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos 90%, 95% o 98% de identidad o similitud que la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4.

10 Las moléculas de anticuerpo del primer y segundo aspectos de la presente invención comprenden preferiblemente una cadena ligera complementaria o una cadena pesada complementaria, respectivamente.

Preferiblemente, el anticuerpo según cualquiera del primer y segundo aspecto de la presente invención comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 5 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 6 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 7 para CDR-H3 y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 8 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 9 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 10 para CDR-L3.

15 En una realización del primer y segundo aspecto de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 2 y una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4.

20 Por lo tanto en una realización más, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia con al menos 60% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 2 y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos el 60% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos el 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 2 y una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos el 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4.

25 En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo según cualquiera el primer o el segundo aspecto de la invención, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

30 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, el anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 2 y una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4.

35 En una realización alternativamente preferida del tercer aspecto de la invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal de murina, en el que el anticuerpo monoclonal comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en la que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 2 y en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4. Este anticuerpo monoclonal de murina se refiere en la presente memoria como 'IL-17F4.100' o como el anticuerpo "donador". Las secuencias completas de nucleótido y aminoácido de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de IL-17F4.100 de anticuerpo monoclonal de ratón se muestran en las Figuras 1a y 1b y se proporcionan en las SEC ID N°: 1 a 4. Las CDR proporcionadas en las SEC ID N°: 5 a 10 proceden de IL-17F4.100 de anticuerpo monoclonal de murina.

40 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una molécula de anticuerpo injertada con CDR, en la que una o más de las CDR se han obtenido del IL-17F4.100 de anticuerpo monoclonal de murina (SEC ID N°: 5 a 10). Como se usa en la presente memoria, el término 'molécula de anticuerpo injertada con CDR' se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una o más CDR modificadas) de un anticuerpo donador (por ej., un anticuerpo monoclonal de murina) injertado en un entramado de la región variable de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo receptor (por ej., un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology, 16, 535-539,1.998.

45 Cuando se injertan las CDR, se puede usar cualquier secuencia del entramado de la región variable del receptor apropiada teniendo en cuenta la clase/el tipo del anticuerpo del donador del que proceden las CDR, incluyendo regiones del entramado de ratón, primate y ser humano. Preferiblemente, el anticuerpo injertado con CDR del cuarto aspecto de la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones del entramado del receptor humano así como una o más de las CDR procedentes del anticuerpo del donador como se refirió anteriormente. Así, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR neutralizante en el que el dominio variable comprende regiones del

entramado del receptor humano y no humano, preferiblemente CDR de donadores, murinos.

Ejemplos de entramados humanos que se pueden usar en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat *et al.*, *supra*). Por ejemplo, se pueden usar KOL y NEWM para la cadena pesada, se puede usar REI para la cadena ligera y se pueden usar EU, LAY y POM tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, se pueden usar secuencias de líneas germinales humanas; éstas están disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>

En un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, no se requiere necesariamente que las cadenas pesada y ligera del receptor procedan del mismo anticuerpo y puede comprender, si se desea, cadenas de material compuesto con regiones de entramado procedentes de diferentes cadenas.

La región del entramado preferida para la cadena pesada del anticuerpo injertado con CDR de la presente invención procede de la secuencia 1-3 3-33 del sub-grupo VH3 humano junto con JH4 (mostrado en la Figura 2; SEC ID N°: 20 y 21). De acuerdo con esto, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR neutralizante que comprende al menos una CDR del donador no humano en la que la región de entramado de la cadena pesada procede de la secuencia 1-3 3-33 del sub-grupo humano junto con JH4. La secuencia de JH4 humano es como sigue: (YFDY)WGQGLTVSS (SEC ID N°: 21). La unidad YFDY es parte de CDR-H3 y no es parte del entramado 4 (Ravetch, J.V. *et al.*, 1.981, *Cell*, 27, 583-591). La secuencia donadora es la secuencia IL-17F4.100 VH (SEC ID N°: 2) mostrada en la Figura 1a.

La región del entramado preferida para la cadena ligera del anticuerpo injertado con CDR de la presente invención procede de la secuencia 2-1-(1) O12 del sub-grupo VK1 de la línea germinal humana junto con JK1 mostrado en la Figura 2 (SEC ID N°: 22 y 23). De acuerdo con esto, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR neutralizante que comprende al menos una CDR del donador no humano en la que la región del entramado de la cadena ligera procede de la secuencia VK1 2-1-(1) O12 del sub-grupo humano junto con JK1. La secuencia JK1 es como sigue: (WT)FGQGTKVEIK (SEC ID N°: 23). La unidad WT es parte de la CDR-L3 y no es parte del entramado 4 (Hieter, P.A., *et al.*, 1.982, *J. Biol. Chem.*, 257, 1.516-1.522). La secuencia donadora es la secuencia IL-17F4.100 VL (SEC ID N°: 4) mostrada en la Figura 1b.

También, en un anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, no se requiere que las regiones del entramado tengan exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo receptor. Por ejemplo, se pueden cambiar restos inusuales a restos que se encuentren con más frecuencia para esa clase o ese tipo de cadena del receptor. Alternativamente, se pueden cambiar restos seleccionados en las regiones del entramado del receptor a fin de que se correspondan al resto encontrado en la misma posición en el anticuerpo del donador (véase Reichmann *et al.*, 1.998, *Nature*, 332, 323-324). Dichos cambios se deberían mantener al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo del donador. Un protocolo para seleccionar restos en las regiones del entramado del receptor que se puede requerir que se cambien se explica en la patente internacional WO 91/09967.

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo injertada con CDR de la presente invención, si la cadena pesada del receptor tiene la secuencia 1-3 3-33 de VH3 humano junto con JH4, entonces las regiones del entramado del receptor de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDR del donador, un resto donador en al menos una de las posiciones 24 y 78, preferiblemente tanto en la posición 24 como 78 (según Kabat *et al.*, (*supra*)). De acuerdo con esto, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR, en el que al menos los restos en la posición 24 y 78 del dominio variable de la cadena pesada son restos donadores.

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo injertada con CDR según la presente invención, si la cadena ligera del receptor tiene la secuencia 2-1-(1) O12 del sub-grupo VK1 humano junto con JK1, entonces las regiones del entramado del receptor de la cadena ligera comprenden un resto donador en la posición 2 (según Kabat *et al.*, *supra*). De acuerdo con esto, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR en el que al menos el resto en la posición 2 es un resto donador.

Los restos donadores son restos del anticuerpo del donador, es decir el anticuerpo del que procedían originalmente las CDR, que en el caso de la presente invención es el anticuerpo monoclonal de murina IL-17F4.100.

En una realización alternativa del primer o cuarto aspecto de la presente invención, la cadena pesada comprende preferiblemente la secuencia de gH11 (SEC ID N°: 11). La secuencia del dominio variable de esta cadena pesada injertada se muestra en la Figura 3a (empezando en la base 64).

En una realización alternativa del segundo o cuarto aspecto de la presente invención, la cadena ligera comprende preferiblemente la secuencia de gL3 (SEC ID N°: 13). La secuencia del dominio variable de esta cadena ligera injertada se muestra en la Figura 3b (empezando en la base 64).

Más preferiblemente, una molécula de anticuerpo según la realización alternativa del primer, segundo o cuarto aspecto de la presente invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de gH11 (SEC ID N°: 11) y una cadena ligera que comprende la secuencia de gL3 (SEC ID N°: 13).

En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia con al menos el 60% de identidad o similitud a la secuencia

proporcionada en la SEC ID N°: 11 y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia con al menos el 60% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 13. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 11 y una cadena ligera, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 13.

La molécula de anticuerpo de la presente invención puede comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de las mismas, tal como un fragmento Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv o scFv. Alternativamente, puede comprender un monómero o dímero de cadena ligera o de cadena pesada o un anticuerpo de cadena única, por ej., un Fv de cadena única en que se unen los dominios variables de cadena pesada y ligera mediante un ligador de péptidos. De manera similar, las regiones variables de cadena pesada y ligera se pueden combinar con otros dominios de anticuerpos como sea apropiado. Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son conocidos en la técnica (véase por ejemplo Verma et al., 1.998, Journal of Immunological Methods, 216,165-181).

Los dominios de región constantes de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si hay, se pueden seleccionar teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo y en particular las funciones efectoras que se pueden requerir. Por ejemplo, los dominios de región constantes pueden ser dominios IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanos. En particular, se pueden usar dominios de región constante IgG humanos, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo se destina a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras del anticuerpo. Alternativamente, se pueden usar los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo se destina a usos terapéuticos y no se requieran funciones efectoras del anticuerpo, por ej., para actividad de IL-17 de bloqueo simplemente.

Los fragmentos de anticuerpo particulares para uso en la presente invención incluyen fragmentos Fab y Fab' y los descritos en las solicitudes de patente internacionales WO 2005/003169, WO 2005/003170 y WO 2005/003171 (Publicada el 13-1-2.005). En particular se prefieren los fragmentos Fab de anticuerpo modificados descritos en la solicitud de patente internacional WO 2005/003169. Estos fragmentos Fab comprenden un par de cadenas pesada y ligera, V_H/C_{H1} y V_L/C_L ligadas mediante enlaces covalentes a través de cisteínas en las regiones constantes de cadena pesada y ligera y se caracterizan por que la región constante de cadena pesada termina en la cisteína intercadena de C_{H1}. El término 'cisteína intercadena' se refiere a una cisteína en la región constante de cadenas pesadas o ligeras que se ligará mediante disulfuro a una cisteína en la correspondiente región constante de cadenas pesadas o ligeras codificadas en un gen de anticuerpo de línea germinal que se encuentra en la naturaleza. En particular las cisteínas intercadena son una cisteína en la región constante de la cadena ligera (C_L) y una cisteína en la primera región constante de la cadena pesada (C_{H1}) que se ligan mediante disulfuro entre sí en anticuerpos que se encuentran en la naturaleza. Los ejemplos de dichas cisteínas se encuentran típicamente en la posición 214 de la cadena ligera y 233 de la cadena pesada de IgG1 humana, 127 de la cadena pesada de IgM, IgE, IgG2, IgG3, IgG4 humana y 128 de la cadena pesada de IgD humana e IgA2B, como se define por Kabat *et al.*, 1.987, en Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., NIH, USA. En IgG de murina, se pueden encontrar cisteínas intercadena en la posición 214 de la cadena ligera y 235 de la cadena pesada. Se apreciará que las posiciones exactas de estas cisteínas pueden variar de las de anticuerpos que se encuentran en la naturaleza si se ha realizado cualquier modificación, tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones al fragmento Fab del anticuerpo. Estos fragmentos Fab de anticuerpos se pueden preparar por cualquier método conocido adecuado en la técnica. Por ejemplo, el fragmento Fab de anticuerpos se puede obtener de cualquier anticuerpo completo, especialmente un anticuerpo monoclonal completo, usando cualquier técnica adecuada de escisión y/o digestión enzimática, por ejemplo por tratamiento con pepsina o papaína y proteasas c-terminales. Preferiblemente estos fragmentos Fab de anticuerpos se preparan por el uso de técnicas de ADN recombinante que implican la manipulación y re-expresión de regiones variables y constantes de anticuerpos codificadores de ADN. Se pueden usar técnicas de biología molecular clásicas para modificar, añadir o suprimir aminoácidos o dominios adicionales como se desee. Cualquier modificación a las regiones variables o constantes se incluye aún por los términos regiones 'variables' y 'constantes' como se usan en la presente memoria. Preferiblemente se usa PCR para introducir un codón de detención inmediatamente después del codón que codifica la cisteína intercadena de C_{H1}, de manera que la traducción del dominio de C_{H1} se detiene en la cisteína intercadena. Los métodos para designar cebadores PCR adecuados son conocidos en la técnica y las secuencias de los dominios de C_{H1} de anticuerpos están fácilmente disponibles (Kabat *et al.*, *supra*). Alternativamente se pueden introducir codones de detención usando técnicas de mutagénesis dirigida al sitio tales como las descritas en White (Ed.), PCR Protocols: Current Methods and Applications (1.993). En un ejemplo las regiones constantes en estos fragmentos proceden de IgG1 y la cisteína intercadena de C_L está en la posición 214 de la cadena ligera y la cisteína intercadena de C_{H1} está en la posición 233 de la cadena pesada.

En una realización preferida del primer, segundo o cuarto aspecto de la invención, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es una molécula de anticuerpo neutralizante, en la que su cadena pesada comprende o consiste en la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 16 y la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia proporcionada en la SEC ID: 18. Lo más preferiblemente, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es una molécula de anticuerpo neutralizante con un formato de anticuerpo como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2005/003169 en el que su cadena pesada comprende o consiste en la secuencia proporcionada

en la SEC ID N°: 16 y en el que su cadena ligera comprende o consiste en la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 18.

En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 16 y la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 18. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en el que la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 16 y una cadena ligera, en el que la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 90%, 95% o 98% de identidad o similitud a la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 18.

En un quinto aspecto de la invención, se proporciona una región o epítipo específico de la IL-17 humana en el que la unión de IL-17F4.100 o anticuerpos que comprenden la secuencia de cadena pesada gH11 (SEC ID N°: 11) y la secuencia de cadena ligera gL3 (SEC ID N°: 13) neutraliza completamente la actividad de la proteína de IL-17.

Esta región o epítipo específico del polipéptido de IL-17 humana se puede identificar por cualquier método de cartografía de epítipos adecuado conocido en la técnica junto con uno cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de dichos métodos incluyen péptidos de investigación de diversas longitudes procedentes de IL-17 para unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que se une de manera específica al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos de IL-17 se pueden producir de manera sintética o por digestión proteolítica del polipéptido de IL-17. Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar, por ejemplo, por análisis espectrométrico de masas. En otro ejemplo, se puede usar espectroscopía de RMN para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, se puede usar el fragmento epitópico que une un anticuerpo de la presente invención, si se requiere, como un inmunógeno para obtener anticuerpos neutralizantes adicionales que unan el mismo epítipo.

Los anticuerpos que realizan bloqueo cruzado para la unión de los anticuerpos del primer a cuarto aspecto de la presente invención para IL-17 pueden ser útiles de manera similar en la neutralización de la actividad de IL-17. En un sexto aspecto de la invención, por lo tanto, se proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, que realiza bloqueo cruzado para la unión de uno cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el primer a cuarto aspecto de la presente invención para IL-17 humana y/o realiza bloqueo cruzado de la unión IL-17 mediante uno cualquiera de esos anticuerpos. En una realización el anticuerpo neutralizante del sexto aspecto de la presente invención se une al mismo epítipo que un anticuerpo proporcionado por el primer a cuarto aspecto de la presente invención. En más realizaciones el anticuerpo neutralizante del sexto aspecto de la presente invención se une a un epítipo que limita y/o se solapa con el epítipo unido mediante un anticuerpo del primer a cuarto aspecto de la invención. En otra realización más el anticuerpo neutralizante del sexto aspecto de la invención no se une al mismo epítipo como un anticuerpo del primer a cuarto aspecto de la invención o un epítipo que limita y/o se superpone con dicho epítipo.

Los anticuerpos que realizan bloqueo cruzado según el sexto aspecto de la presente invención se pueden identificar usando cualquier método adecuado en la técnica, por ejemplo usando ELISA de competición o BIAcore donde la unión del anticuerpo de bloqueo cruzado del sexto aspecto de la invención a IL-17 humana evita la unión de un anticuerpo proporcionado en el primer a cuarto aspecto de la presente invención o viceversa.

En una realización se proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, que realiza bloqueo cruzado para la unión de IL17F4.100 o un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH11 (SEC ID N°: 11) y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL3 (SEC ID N°: 13) para IL-17 humana. En una realización, los anticuerpos que realizan bloqueo cruzado proporcionados inhiben la unión de IL17F4.100 o un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH11 (SEC ID N°: 11) y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL3 (SEC ID N°: 13) por más de 80%, preferiblemente por más de 85%, más preferiblemente por más de 90%, incluso más preferiblemente por más de 95%.

Alternativamente o además, los anticuerpos pueden experimentar bloqueo cruzado de la unión a IL-17 humana por uno cualquiera de los anticuerpos del primer a cuarto aspecto de la presente invención. También se proporciona por lo tanto una molécula de anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana que experimenta bloqueo cruzado de la unión a IL-17 humana por el anticuerpo IL17F4.100 o un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH11 (SEC ID N°: 11) y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL3 (SEC ID N°: 13). En una realización los anticuerpos que realizan bloqueo cruzado proporcionados por el sexto aspecto de la invención son inhibidos de la unión a IL-17 humana por IL17F4.100 o un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH11 (SEC ID N°: 11) y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL3 (SEC ID N°: 13) por más de 80%, preferiblemente por más de 85%, más preferiblemente por más de 90%, incluso más preferiblemente por más de 95%.

La molécula de anticuerpo de cualquier aspecto de la presente invención tiene preferiblemente una alta afinidad de unión, preferiblemente picomolar. Preferiblemente la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una

afinidad de unión de entre aproximadamente 1 y 500 pM. En una realización la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 400 pM. Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención se puede modificar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. La presente invención por lo tanto también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada para IL-17. Dichas variantes se pueden obtener mediante una serie de protocolos de maduración de afinidad incluyendo la mutación de las CDR (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1.995), organización de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1.992), uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1.996), organización de ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1.997), indicador de fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1.996) y PCR sexual (Cramer *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1.998). Vaughan *et al.* (*supra*) discuten estos métodos de maduración de afinidad.

Si se desea un anticuerpo para uso en la presente invención se puede conjugar a una o más moléculas efectoras. Se apreciará que la molécula efectora puede comprender una sola molécula efectora o dos o más de dichas moléculas unidas a fin de formar un único resto que se pueda unir a los anticuerpos de la presente invención. En el caso de que se desee obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, éste puede ser preparado por procedimientos químicos o de ADN recombinante clásicos en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o vía un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a anticuerpos son conocidas en la técnica (véase, Hellstrom *et al.*, Controlled Drug Delivery, 2ª Ed., Robinson *et al.*, eds., 1.987, págs. 623-53; Thorpe *et al.*, 1.982, Immunol. Rev., 62: 119-58 y Dubowchik *et al.*, 1.999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en las patentes internacionales WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO 03031581. Alternativamente, en el caso de que la molécula efectora sea una proteína o un polipéptido la unión se puede conseguir usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en la patente internacional WO 86/01533 y la patente europea EP 0392745.

El término molécula efectora como se usa en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o que se encuentran en la naturaleza, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos por ej., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, en particular radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos informadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que se pueden detectar por espectroscopía de RMN o ESR (por sus siglas en inglés).

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos incluyendo cualquier agente que sea perjudicial para (por ej., destruya) las células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilones, estaurosporina, maytansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracildecabazina), agentes alquilantes (por ej., mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiaminplatino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ej., daunorubicina (antiguamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ej., dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), calicheamicinas o duocarmicinas) y agentes antimetabólicos (por ej., vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como ^{111}In e ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Renio 188 o fármacos tales como, pero no limitado a, alquilfosfolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, α -interferón, β -interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento procedente de plaquetas o activador plasminógeno de tejido, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, por ej., angioestatina o endostatina, o, un modificador de la respuesta biológica tal como una linfocina, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) u otro factor de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en diagnóstico. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en

- tomografía de emisión de positrones) e iones de metales paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la Patente de EE.UU. N° 4.741.900 para iones de metal que se pueden conjugar a anticuerpos para uso como diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina y núclidos radiactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In y ⁹⁹Tc.
- 5 En otro ejemplo la molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o mejorar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas que se unen a albúmina o compuestos que se unen a albúmina tales como los descritos en la patente internacional WO 2005/117984.
- 10 En el caso de que la molécula efectora sea un polímero puede ser, en general, un polímero sintético o uno que se encuentre en la naturaleza, por ejemplo un polialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, polímero de polialquileno o polioxialquileno o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ej., un homo- o heteropolisacárido.
- 15 Sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos ya mencionados incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi.
- 20 Ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol) poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados de los mismos.
- Los polímeros que se encuentran en la naturaleza particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.
- 25 "Derivados" como se usa en la presente memoria se destina que incluya derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos electivos de tiol tales como maleimidados y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento ligador al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo formará parte en algunos casos del producto como el grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.
- 30 El tamaño del polímero se puede variar como se desee, pero estará en general en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50.000 Da, preferiblemente de 5.000 a 40.000 Da y más preferiblemente de 20.000 a 40.000 Da. El tamaño del polímero se puede seleccionar en particular sobre la base del uso deseado del producto por ejemplo capacidad para localizar ciertos tejidos tales como tumores o prolongar la semivida de circulación (para revisión véase Chapman, 2.002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, en el caso de que el producto se destine a la circulación y penetre el tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de alrededor de 5.000 Da. Para aplicaciones en que el producto quede en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular mayor, por ejemplo con un peso molecular en el intervalo de 20.000 Da a 40.000 Da.
- 35 Los polímeros preferidos en particular incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15.000 Da a aproximadamente 40.000 Da.
- 40 En un ejemplo los anticuerpos para uso en la presente invención están unidos a restos poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG se pueden unir a través de cualquier cadena lateral de aminoácidos o grupo funcional de aminoácido terminal disponible situado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden encontrarse en la naturaleza en el fragmento de anticuerpo o se pueden lograr en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo la patente de EE.UU. 5.219.996; la patente de EE.UU. 5.667.425; la patente internacional WO 98/25971). En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos que permitan la unión de una molécula efectora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más restos cisteína a que se puede unir la molécula efectora. Se pueden usar múltiples sitios para unir dos o más moléculas PEG.
- 45 50 Preferiblemente las moléculas PEG se unen mediante enlaces covalentes a través de un grupo tiol de al menos un resto cisteína situado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula polimérica unida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar unido mediante enlaces covalentes al átomo de azufre de un resto cisteína situado en el fragmento. La unión covalente será en general un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. En el caso de que se use un grupo tiol como el punto de unión se pueden usar moléculas efectoras activadas de manera apropiada, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidados y derivados de cisteína. Se puede usar un polímero activado como el material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados de
- 55

polímero como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contiene un grupo reactivo tiol tal como un ácido o éster α -halocarboxílico, por ej., yodoacetamida, una imida, por ej., maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida se pueden obtener comercialmente (por ejemplo de Nektar, antiguamente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA) o se puede preparar a partir de materiales de partida comercialmente disponibles usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina de 20K (obtenible de Nektar, antiguamente Shearwater; Rapp Polymere y SunBio) y M-PEG-SPA (obtenible de Nektar, antiguamente Shearwater).

En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado que está PEGilado, es decir tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido mediante enlaces covalentes al mismo, por ej., según el método desvelado en la patente europea EP 0948544 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1.992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1.997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1.998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2.002, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2.002, 54: 531-545]. En un ejemplo PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado de PEG tiene un grupo maleimida unido mediante enlaces covalentes a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un resto lisina puede estar unido mediante enlaces covalentes al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amino en el resto lisina puede estar unido un polímero de metoxipoli(etilenglicol) con un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser por lo tanto aproximadamente 40.000 Da.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, que es un fragmento Fab modificado con un cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 13 y que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada una región bisagra modificada que contiene al menos un resto cisteína al que está unido una molécula efectora. Preferiblemente la molécula efectora es PEG y se une usando los métodos descritos en (la patente internacional WO 98/25971 y la patente internacional WO 2004072116) según lo cual se une un grupo lisil-maleimida al resto cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada y cada grupo amino del resto lisilo tiene unido a él mediante enlaces covalentes un resto metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es por lo tanto aproximadamente 40.000 Da.

En otro ejemplo, las moléculas efectoras pueden estar unidas a fragmentos de anticuerpo usando los métodos descritos en las solicitudes de patente internacional WO 2005/003169, WO 2005/003170 y WO 2005/003171.

En otra realización preferida un fragmento de anticuerpo para uso en la presente invención es un fragmento Fab PEGilado (es decir tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido mediante enlaces covalentes al mismo) como se describe en la Solicitud de Patente Internacional Número WO 2005/003169. Este fragmento Fab PEGilado es un fragmento Fab en que la cadena pesada termina en la cisteína intercadena de C_H1 y el PEG unido al fragmento, preferiblemente PEG-maleimida, está unido mediante enlaces covalentes a la cisteína intercadena de C_L y la cisteína intercadena de C_H1 . Preferiblemente, la cisteína intercadena de C_L está en la posición 214 de la cadena ligera y la cisteína intercadena de C_H1 está en la posición 233 de la cadena pesada. Como se discutió anteriormente la cantidad total de PEG unido al fragmento se puede variar como se desee. En un ejemplo cada polímero unido al Fab tiene preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por ejemplo, el peso molecular puede ser 15.000-25.000 Da o preferiblemente 18.000-22.000 Da e incluso más preferiblemente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es por lo tanto aproximadamente 30.000 a 50.000 Da, preferiblemente 40.000 Da.

PEG se une a estos fragmentos reduciendo primero el enlace disulfuro intercadena entre las cisteínas intercadena de C_L y C_H1 y uniéndolo con posterioridad el PEG a los tioles libres. Una vez que el PEG se une a las cisteínas intercadena no hay enlace disulfuro intercadenas entre la cadena pesada y ligera. Los agentes reductores adecuados para reducir el enlace disulfuro intercadenas son extensamente conocidos en la técnica por ejemplo los descritos en Singh *et al.*, 1.995, *Methods in Enzymology*, 251, 167-73. Ejemplos particulares incluyen agentes reductores a base de tiol tales como glutatión reducido (GSH), β -mercaptoetanol (β -ME), β -mercaptoetilamina (β -MA) y ditiotreitól (DTT). Otros métodos incluyen usar métodos electrolíticos, tales como el método descrito en Leach *et al.*, 1.965, *Div. Protein. Chem*, 4, 23-27 y usar métodos de fotoreducción, tales como el método descrito en Ellison *et al.*, 2.000, *Biotechniques*, 28 (2), 324-326. Preferiblemente sin embargo, el agente reductor es un agente reductor no a base de tiol, preferiblemente uno de los agentes reductores de trialquilfosfina (Ruegg UT y Rudinger, J., 1.977, *Methods in Enzymology*, 47, 111-126; Burns J *et al.*, 1.991, *J. Org. Chem*, 56, 2.648-2.650; Getz *et al.*, 1.999, *Analytical Biochemistry*, 273, 73-80; Han and Han, 1.994, *Analytical Biochemistry*, 220, 5-10; Seitz *et al.*, 1.999, *Euro. J. Nuclear Medicine*, 26, 1.265-1.273), ejemplos particulares de los cuales incluyen: tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), trisbutilfosfina (TBP), tris-(2-cianoetil)fosfina, tris-(3-hidroxipropil)fosfina (THP) y tris-(2-hidroxietil)fosfina. Lo más preferido son los agentes reductores TCEP y THP. Será evidente para un experto en la materia que la concentración de agente reductor se puede determinar de manera empírica, por ejemplo, variando la concentración de agente reductor y midiendo el número de tioles libres producidos. Típicamente el agente reductor se usa en exceso sobre el fragmento de anticuerpo por ejemplo entre 2 y 1.000 veces de exceso molar. Preferiblemente, el agente reductor está en exceso de 2, 3, 4, 5, 10, 100 ó 1.000 veces. En una realización, el reductor se usa en entre 2 y 5 mM.

Las reacciones de reducción y PEGilación se pueden realizar en general en un disolvente, por ejemplo una disolución tampón acuosa tal como acetato o fosfato, a pH alrededor de neutro, por ejemplo alrededor de pH 4,5 a alrededor de pH 8,5, típicamente pH 4,5 a 8, convenientemente pH 6 a 7. Las reacciones se pueden realizar en general a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 70°C, por ejemplo a temperatura ambiente. El disolvente puede contener opcionalmente un agente quelante tal como AEDT, EGTA, CDTA o DTPA. Preferiblemente, el disolvente contiene AEDT en entre 1 y 5 mM, preferiblemente 2 mM. Alternativamente o además, el disolvente puede ser un tampón quelante tal como ácido cítrico, ácido oxálico, ácido fólico, bicina, tricina, tris o ADA. El PEG se empleará en general en concentración en exceso relativa a la concentración del fragmento de anticuerpo. Típicamente el PEG está en exceso entre 2 y 100 veces molar, preferiblemente exceso de 5, 10 ó 50 veces.

En el caso de que sea necesario, el producto deseado que contiene el número deseado de moléculas de PEG se puede separar de cualquier material de partida u otro producto generado durante el procedimiento de producción por medios convencionales, por ejemplo por técnicas cromatográficas tales como intercambio iónico, exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad de proteína A, G o L o cromatografía de interacción hidrófoba.

Por lo tanto en una realización preferida, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, que es un fragmento Fab como se describe en la Solicitud de Patente Internacional Número WO 2005/003169, con una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 18 a la que está unida una o más moléculas efectoras, preferiblemente dos o más.

Lo más preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab PEGilado (es decir, tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido mediante enlaces covalentes al mismo) como se describe en la Solicitud de Patente Internacional Número WO 2005/003169. La presente invención proporciona por lo tanto un fragmento Fab PEGilado, CDP435, que es una molécula de anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, con una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 18 a que está unido PEG, preferiblemente PEG-maleimida, mediante enlaces covalentes a la cisteína intercadena de C_L y la cisteína intercadena de C_H1. Preferiblemente, la cisteína intercadena de C_L está en la posición 214 de la cadena ligera y la cisteína intercadena de C_H1 está en la posición 233 de la cadena pesada (Kabat *et al.* (*supra*)). En el fragmento de anticuerpo de CDP435 estas cisteínas se pueden encontrar por numeración secuencial en las posiciones 222 y 218 de la cadena pesada y ligera, respectivamente. Preferiblemente, cada PEG unido al Fab tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da y el peso molecular total del PEG unido al Fab es por lo tanto aproximadamente 40.000 Da. Una representación en diagrama de la estructura del fragmento Fab PEGilado, CDP435 se muestra en la Figura 15. n está típicamente entre aproximadamente 400 y aproximadamente 520. En un ejemplo n está entre 415 y 505. En un ejemplo n es aproximadamente 460.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena o las cadenas pesadas y/o ligeras de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o la ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por tratamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener por métodos conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican parte o todo de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos se pueden sintetizar como se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o sobre la base de las correspondientes secuencias de aminoácidos.

El ADN que codifica secuencias de entramado receptoras está extensamente disponible para los expertos en la materia y se puede sintetizar fácilmente sobre la base de sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Se pueden usar técnicas clásicas de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifiquen la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden sintetizar las secuencias de ADN deseadas completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden usar técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y de reacción de cadena de polimerasa (PCR) como sea apropiado.

Se proporcionan ejemplos de secuencias adecuadas en la SEC ID N°: 1; SEC ID N°: 3; SEC ID N°:12; SEC ID N°:14; SEC ID N°:15 y SEC ID N°:17.

La presente invención también se refiere a un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. De acuerdo con esto, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, el vector de clonación o expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente. Preferiblemente, un vector según la presente invención comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°:19. Las bases 1-63 y 722-784 codifican la secuencia líder OmpA de *E. coli* que se escinde lo más preferiblemente para proporcionar una

molécula de anticuerpo neutralizante de la presente invención. Las bases 718 a 721 entre las secuencias de las cadenas ligera y pesada representan una secuencia intergénica para uso en la expresión de anticuerpo en *E. coli* (patente internacional WO 03/048208).

5 Los métodos generales por los que se pueden construir los vectores, métodos de transfección y métodos de cultivo son conocidos para los expertos en la materia. Por lo que se refiere a esto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1.999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y el Manual Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

10 También se proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Cualquier sistema célula huésped/vector adecuado se puede usar para expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo *E. coli*, y otros sistemas microbianos o también se pueden usar sistemas de expresión de células huésped eucariotas, por ejemplo de mamíferos. Las células huésped de mamífero, adecuadas, incluyen CHO, mieloma o células de hibridoma.

15 La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo según la presente invención que comprende cultivar una célula huésped que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención y aislar la molécula de anticuerpo.

20 La molécula de anticuerpo puede comprender sólo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso sólo se requiere usar una secuencia codificadora de polipéptidos de cadena pesada o de cadena ligera para transfectar las células huésped. Para la producción de productos que comprenden cadenas tanto pesadas como ligeras, la estirpe celular se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un solo vector, incluyendo el vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

25 Como los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección patológica, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con esto, se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición se suministrará normalmente como parte de una composición farmacéutica, estéril, que incluirá normalmente un portador farmacéuticamente aceptable. Una
30 composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

35 La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo en la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede ir acompañada por otros ingredientes activos incluyendo otros ingredientes anticuerpos, por ejemplo anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-célula T, anti-IFN γ o anti-LPS o ingredientes no anticuerpos tales como xantinas.

40 Las composiciones farmacéuticas comprenden preferiblemente una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente memoria se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección diana o para presentar un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente en ensayos de cultivos celulares o en modelos animales, normalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal también se puede usar para determinar el intervalo
45 de concentración y la vía de administración apropiada. Dicha información se puede usar entonces para determinar dosis y vías de administración útiles en seres humanos.

La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un individuo humano dependerá de la importancia de la condición patológica, la salud general del individuo, la edad, el peso y el género del individuo, la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación o las combinaciones de fármacos, sensibilidades de reacción y
50 tolerancia/respuesta al tratamiento. Esta cantidad se puede determinar por experimentación de rutina y está dentro del criterio del médico. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas farmacéuticas unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

55 Las composiciones se pueden administrar de manera individual a un paciente o se pueden administrar en asociación (por ej., de manera simultánea, de manera secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la

afección que se tenga que tratar, la extensión de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se esté usando de manera profiláctica o para tratar una afección existente.

5 La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ej., 2 a 10 horas) puede que sea necesario proporcionar una o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ej., 2 a 15 días) sólo puede ser necesario proporcionar una dosis una sola vez al día, una sola vez a la semana o incluso una sola vez cada 1 ó 2 meses.

10 El portador farmacéuticamente aceptable no debería inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición y no debería ser tóxico. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

15 Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácido mineral, tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

20 Los portadores farmacéuticamente aceptables en composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, disolución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH, en dichas composiciones. Dichos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas que se tienen que formular como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones acuosas y suspensiones, para ingestión por el paciente.

25 Las formas de administración preferidas incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ej., por inyección o infusión intravenosa, por ejemplo por inyección intravenosa rápida o infusión intravenosa continua. En el caso de que el producto sea para inyección o infusión intravenosa, puede tomar la forma de una suspensión, disolución o emulsión en un vehículo oleoso o acuoso y puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes de uso con un líquido estéril apropiado.

30 Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al individuo. Los individuos que se tienen que tratar pueden ser animales. Sin embargo, se prefiere que las composiciones se adapten para administración a individuos humanos.

35 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por cualquier número de vías incluyendo, pero no limitado a, vías oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase la patente internacional WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se puede usar hipoaerosoles para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, como disoluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, vehículos líquidos previamente a inyección.

40 El suministro directo de las composiciones estará acompañado en general por inyección, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa o por vía intramuscular o suministrar al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también se pueden administrar a una lesión. El tratamiento de dosificación puede ser un plan de una sola dosis o un plan de dosis múltiples.

45 Se apreciará que el ingrediente activo en la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tubo digestivo. Así, si la composición se tiene que administrar por una vía usando el tubo digestivo, se necesitará que la composición contenga agentes que protejan el anticuerpo de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que se haya absorbido desde el tubo digestivo.

Una discusión amplia de portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N. J. 1.991).

50 También se prevé que el anticuerpo de la presente invención se administre por uso de tratamiento génico. Para conseguir esto, se introducen secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes adecuados de ADN en un paciente de manera que las cadenas de anticuerpo se expresen a partir de las secuencias de ADN y se ensamblen *in situ*.

La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo para uso en el control de enfermedades inflamatorias. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se puede usar para reducir el procedimiento inflamatorio o para prevenir el procedimiento inflamatorio.

55 La presente invención también proporciona la molécula de anticuerpo de la presente invención para uso en el

- tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico que esté mediado por IL-17 o esté asociado a un nivel aumentado de IL-17. Preferiblemente, la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias) choque endotóxico asociado a infección, artritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria pélvica, Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Crohn, Enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, colecistopatía, enfermedad pilonidal, peritonitis, soriasis, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, apoplejía, Diabetes Tipo I, artritis de Lyme, meningococcal, trastornos inflamatorios mediados inmunitarios del sistema nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple y síndrome de Guillain-Barré, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, trauma (cirugía), enfermedad del injerto contra el hospedador, rechazo de trasplantes, cáncer (tanto tumores sólidos como melanomas, hepatoblastomas, sarcomas, carcinomas de células escamosas, tumores malignos de células transitorias, tumores malignos de ovario y tumores malignos hematológicos y en particular leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, cáncer gástrico y cáncer de colon), enfermedad cardíaca incluyendo enfermedades isquémicas tales como infarto agudo de miocardio así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, periodontitis e hipoclorhidia.
- La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo según la presente invención para uso en el tratamiento o la profilaxis de dolor.
- La presente invención proporciona además el uso de una molécula de anticuerpo según la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico que esté mediado por IL-17 o se asocie a un nivel aumentado de IL-17. Preferiblemente, el trastorno patológico es artritis reumatoide o esclerosis múltiple.
- La presente invención proporciona además el uso de una molécula de anticuerpo según la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de dolor.
- Una molécula de anticuerpo de la presente invención se puede utilizar en cualquier tratamiento donde se deseen reducir los efectos de IL-17 en el cuerpo humano o de animal. IL-17 puede estar circulando en el cuerpo o puede estar presente en un nivel indeseablemente alto localizado en un sitio particular en el cuerpo, por ejemplo un sitio de inflamación.
- La molécula de anticuerpo de la presente invención se usa preferiblemente para el control de enfermedad inflamatoria.
- La presente invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo de la presente invención para el tratamiento de individuos humanos o animales que padecen de o están en riesgo de un trastorno mediado por IL-17.
- La molécula de anticuerpo de la presente invención también puede ser usada en diagnóstico, por ejemplo en el diagnóstico *in vivo* y el diagnóstico por la imagen de condiciones patológicas que implican IL-17.
- La presente invención se describe además como ilustración sólo en los siguientes ejemplos, que se refieren a las Figuras que se adjuntan, en que:
- La Figura 1a) muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos (SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente) de los dominios variables de la cadena pesada y la Figura 1b) muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos (SEC ID N°: 3 y 4, respectivamente) de los dominios variables de la cadena ligera de anticuerpo monoclonal de murina IL-17F4.100. En las dos figuras las posiciones 1-57 (numeración de secuencias de nucleótidos) son las secuencias líder de ratón naturales asociadas a estas regiones variables.
- La Figura 2 muestra el diseño de injerto para las secuencias de cadena pesada (Figura 2a; SEC ID N°: 11) y ligera (Figura 2b; SEC ID N°: 13) IL-17F4.100. El símbolo (I) destaca diferencias entre donador:receptor:secuencias de entramado injertado. Las CDR se subrayan solas. Estas son como se define por Kabat, excepto para CDR-H1 que incluye las dos definiciones Kabat y Chothia. Las secuencias con doble subrayado son restos de donador retenidos en los injertos. Los restos con asterisco (*) son comunes en secuencias de línea germinal del sub-grupo VH3 humano, pero no está presente en esta línea germinal particular.
- La Figura 3 muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los genes gH11 designados (Figura 3a) y gL3 (Figura 3b). En las dos cadenas se muestra la secuencia líder *OmpA* de *E. coli* (bases 1-63 de la secuencia de nucleótidos).
- Figura 4. Muestra la secuencia de aminoácidos del fragmento Fab del anticuerpo de CDP435 (a) cadena ligera y (b) cadena pesada.
- Figura 5. Muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos del fragmento Fab del anticuerpo de CDP435. Las bases 1-63 y 722-784 representan la secuencia líder *OmpA* de *E. coli*.
- Figura 6. Mapa de plásmidos de pTTOD (CDP435)
- Figura 7. Una comparación del efecto de CDP435 e IL17F4.100 sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17

humana de células Hela.

Figura 8. El efecto de CDP435 sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17 humana de células Hela.

Figura 9. El efecto de CDP435 sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17 de mono de células Hela.

Figura 10. El efecto de CDP435 sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17F humana de células Hela.

5 Figura 11. El efecto de CDP435 sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17 de ratón de células 3T3-NIH.

Figura 12. Farmacocinética de CDP435 etiquetada con ¹²⁵I por vía subcutánea en ratas.

Figura 13. Neutralización *in vivo* de acumulación de neutrófilos inducidos por hIL-17 en ratones por administración local de CDP435.

10 Figura 14. Neutralización *in vivo* de acumulación de neutrófilos inducidos por hIL-17 en ratones por administración subcutánea de CDP435.

Figura 15. Una representación en diagrama de la estructura de CDP435. n está entre 400 y 520.

Manipulaciones de ADN y métodos generales.

15 Se usó cepa INV α F' de *E. coli* (Invitrogen) para transformación y crecimiento de cultivos de rutina. Se obtuvo restricción de ADN y enzimas de modificación de Roche Diagnostics Ltd. y New England Biolabs. Se realizaron preparaciones de plásmidos usando estuches de purificación Maxi Plasmid (QIAGEN, catálogo N° 12.165). Se realizaron reacciones de secuenciación de ADN usando el estuche de secuenciación ABI Prism Big Dye terminator (catálogo N° 4.304.149) y realizado en un secuenciador automatizado ABI 3100 (Applied Biosystems). Se analizaron los datos usando el programa AutoAssembler (Applied Biosystems). Se obtuvieron oligonucleótidos de OSWEL. La concentración de Fab se determinó usando ELISA de ensamblaje de Fab.

20 Ensayo de neutralización in vitro: fibroblastos primarios.

25 Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos a confluencia del 80% en placas de 96 pozos. Se valoraron los anticuerpos en diluciones semilog de 1 μ g/ml y se añadió IL-17 humana para proporcionar 25 ng/ml de concentración final. Se incubaron Las placas que contenían anticuerpo e IL-17 humana a temperatura ambiente durante 30 min. Se retiró medio de cultivo de cultivos de fibroblastos y se añadieron 100 μ l de mezcla anticuerpo /IL-17 a los pozos apropiados y se cultivaron durante la noche a 37°C. La cantidad de IL-8 producido como respuesta a IL-17 se estimó después usando el Estuche DY208 Duoset de IL-8 Humana de R&D Systems.

Ejemplo 1: Aislamiento de IL-17F4.100

30 Se obtuvo anticuerpo IL-17F4.100 usando técnicas de hibridoma convencionales. Se inmunizaron ratones BALB/C hembra con IL-17 humana recombinante (adquirida de R&D systems). Los ratones recibieron tres inmunizaciones intraperitoneales a intervalos de dos semanas de 10 μ g de IL-17 en 100 μ l de adyuvante de Freund. Tres días previamente a realizar la fusión se reforzó el ratón con 1 μ g de IL-17 humana en 100 μ l de PBS por vía intravenosa. Se realizó la fusión usando el método de Galfre *et al.*, 1.977, Nature, 266, 550-552 con la estirpe celular de mieloma de ratón SP2/0 usada como la pareja de fusión. Se investigó la fusión para anticuerpos que se unían a IL-17 humana mediante ELISA y se seleccionó una serie de hibridomas productores de anticuerpos de esta criba primaria una de 35 las cuales se denominó IL-17F4.100. Las células de hibridoma que producen IL-17F4.100, se clonaron por dilución limitante. Se isotipó el anticuerpo y se encontró que era un IgG γ 2b con una cadena ligera kappa.

Ejemplo 2: Clonación y expresión de genes de las regiones variables de anticuerpo monoclonal de murina IL-17F4.100.

Clonación PCR de regiones VH y VL.

40 Los genes para el dominio variable de cadena pesada (VH) y el dominio variable de cadena ligera (VL) de IL-17F4.100 se aislaron y se secuenciaron después de clonación por PCR de transcripción inversa.

Las secuencias de la región V se muestran en la Figura 1 (empezando en la base 58) y en la SEQ ID N°: 1 a 4.

45 Se sub-clonaron los genes de la región V de murina en vectores de expresión que contenían los genes de región constante de anticuerpos humanos (cadena ligera kappa humana y cadena pesada gamma-4) y un quimérico de ratón/humano expresado de manera transitoria en células CHO. Se realizaron transinfecciones de células CHO usando el procedimiento de lipofectamina según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, catálogo N° 18.324).

Ejemplo 3: Injerto de CDR de IL-17F4.100

Se diseñó una serie de regiones VL y VH en que las regiones hipervariables CDR más un número variable de restos del entramado de IL-17F4.100 se injertaron sobre entramados de receptor de la región V humana.

Se diseñaron tres regiones VL injertadas (gL1 -3) y se construyeron genes por ensamblaje de oligonucleótidos y mutagénesis PCR. También se construyó un total de 16 regiones VH injertadas (gH1-16). Estas secuencias humanizadas se sub-clonaron en vectores que contenían genes de la región constante de anticuerpos humanos, se expresaron de manera transitoria en células CHO y se comparó su actividad en ensayos de unión y neutralización de IL-17 al anticuerpo quimérico que comprendía las regiones variables de IL-17F4.100 y regiones constantes humanas.

El injerto el más potente en la neutralización de IL17 fue gH11gL3 que contenía 1 resto de entramado de ratón en la cadena L (Val-2) y 2 restos de entramado de ratón en la cadena H (Val-24, Val-78).

La Figura 2 muestra una alineación entre la secuencia de ratón donadora y los entramados humanos receptores. El entramado de receptor de cadena pesada es la secuencia de la línea germinal humana VH3 1-3 3,33, viniendo el entramado 4 de esta porción de JH4 de la línea germinal de la región JH humana. El entramado receptor de cadena ligera es la secuencia de línea germinal humana VK1 2-1-(1) O12, viniendo el entramado 4 de esta porción del JK1 de línea germinal de la región JK humana. Las secuencias de injerto para gH11 y gL3 se proporcionan en las Figuras 3a (bases 64-420) y 3b (bases 64-399) respectivamente (SEC ID N°: 11-14).

Ejemplo 4: Producción y caracterización de CDP435.

CDP435 es un fragmento de anticuerpo PEGilado según la presente invención en que el componente de anticuerpo es un fragmento Fab del anticuerpo construido de los injertos producidos en el Ejemplo 3. El componente del fragmento Fab del anticuerpo de CDP435 se construyó usando los genes que codifican el injerto del dominio variable humanizado seleccionado (gH11gL3) que se sub-clonaron en vector de expresión de *E. coli* de Celltech pTTOD, que contenía ADN codificador del dominio CH1 de cadena pesada C γ 1 humano y el dominio de cadena ligera kappa C humano (como se describió previamente en la patente internacional WO 03/048208). Por el contrario para la patente internacional WO 03/048208 la cadena pesada humana se truncó en la región constante de manera que la cisteína disulfuro intercadena (cys-233 por sistema de numeración Kabat, cys-222 por numeración secuencial) es el resto C-terminal. La secuencia proteínica de este Fab injertado con CDR se muestra en la Figuras 4a y 4b (Sec ID N°: 15-18). Se muestra un mapa del vector de expresión dicistrónico pTTOD (CDP435) en la Figura 6 que comprende la construcción proporcionada en la Figura 5 y la SEC ID N°: 19. La construcción contiene una secuencia intergénica, IGS-2, entre los genes de la cadena ligera y pesada (Véase la patente internacional WO 03/048208) y la secuencia líder OmpA al principio de los genes de la cadena tanto ligera como pesada.

El vector pTTOD(CDP435) se transformó en la cepa huésped *E. coli* K12 W3110 y el componente del fragmento Fab del anticuerpo de CDP435 producido en *E. coli* por cultivo de alta densidad celular usando métodos clásicos. Se purificaron anticuerpos usando cromatografía de intercambio catiónico seguido por intercambio aniónico usando métodos clásicos (Humphreys *et al.*, 2.002, Protein Expression and Purification, 26, 309-320).

Producción de CDP435

Se unieron dos moléculas PEG de 20 kDa al componente de fragmento Fab del anticuerpo purificado de CDP435 usando el siguiente método (Véase también el método proporcionado en la solicitud de patente internacional WO 2005/003169). El fragmento Fab del anticuerpo purificado producido como se describió anteriormente se redujo para producir 2 tioles por Fab (ambas cisteínas intercadena) con tris-(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) 10 mM durante 1 hora a temperatura normal. Se retiró el reductor por diafiltración en fosfato 0,1 M + AEDT 2 mM, pH 6,0. El fragmento de anticuerpo reducido de CDP435 fue DiPEGilado sobre las cisteínas intercadena con un exceso molar de 3 veces de PEG-maleimida de 20 kDa sobre Fab, durante la noche a temperatura normal para unir un total de PEG de 40 kDa (es decir, PEG 2x20 kDa) para producir CDP435. Se muestra una representación en diagrama de CDP435 en la Figura 15.

Después de PEGilación se acondicionó la reacción para purificación de CDP435 por reducción del pH a 4,5 (adición de ácido acético) y reducción de la conductividad a 3 mS/cm (adición de agua). Se purificó CDP435 por cromatografía de SP Sepharose HP en acetato 50 mM pH 4,5. Se concentró y se diafiltró material purificado en acetato 50 mM, NaCl 125 mM, pH 5,5 y filtrado estéril de 0,22 μ m.

Ensayo BIAcore

El formato de ensayo usó CDP435 capturado por IgG F(ab) $_2$ anti-humano con una valoración de IL-17 humana recombinante en la fase disolución. Se realizó BIA (Biomolecular Interaction Analysis) usando un BIAcore 3000 (BIAcore AB). Se inmovilizó IgG cabra anti-humano de Fragmento F(ab') $_2$ Affinipure, fragmento F(ab) $_2$ específico (Jackson ImmunoResearch) en un Chip Sensor CM5 por química de acoplamiento de amina a un nivel de captura de \approx 9.000 unidades de respuesta (las UR). Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, AEDT 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005%, BIAcore AB) como el tampón de realización con un caudal de 10 μ l/min. Se realizó una inyección de CDP435 a 10 μ l/min para obtener alrededor de 200 Ur de Fab capturado por el IgG-F(ab) $_2$ anti-humano inmovilizado a la superficie. Se valoró IL-17 humana sobre el fragmento Fab del anticuerpo capturado a diversas concentraciones a un caudal de 30 μ l/min. Se regeneró la superficie por una inyección de 2x10 μ l de HCl 40 mM, seguido por una inyección de 5 μ l de NaOH 5 mM a un caudal de 10 μ l/min.

Se analizaron las curvas de unión de sustracción de fondo usando el programa informático BIAevaluation (versión 3.2) después de procedimientos clásicos. Se determinaron parámetros cinéticos del algoritmo de ajuste. Se midió la afinidad a concentraciones de IL-17 humana a o por debajo de 12,5 nM. El valor de la afinidad determinado para CDP435 estuvo en el intervalo 133-365 pM con una media±SD de 223,8 ± 94,5 pM (Tabla 1).

5 Tabla 1: Afinidad por BIAcore

Replicado	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (M)	K_d pM
1	1,71E+06	3,23E-04	1,891E-10	189
2	1,35E+06	1,79E-04	1,33E-10	133
3	1,83E+06	4,99E-04	2,72E-10	272
4	2,57E+06	4,11E-04	1,60E-10	160
5	1,62E+06	5,92E-04	3,65E-10	365

La Figura 7 demuestra que la actividad de neutralización del fragmento Fab del anticuerpo de CDP435 es equivalente a la del anticuerpo parental IL-17F4.100 de murina en el ensayo de neutralización de IL-17 humana de células Hela (métodos como se describe en el Ejemplo 5).

10 Ejemplo 5: Ensayo de neutralización in vitro usando CDP435.

Células Hela

Se ensayó la potencia de CDP435 contra IL-17 recombinante humana, IL-17 recombinante de mono e IL-17F recombinante humana en células Hela. Se obtuvieron células Hela del banco de células en ATCC (ATCC CCL-2). Se cultivaron células en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) enriquecido con suero fetal bovino al 10%, penicilina, gentamicina y glutamina. Se pusieron en placas 1×10^4 células en placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pozos. Se incubaron células durante la noche y se lavaron una sola vez en tampón de ensayo. Se incubó IL-17 humana (25 ng ml^{-1}), IL-17 de mono (25 ng ml^{-1}) o IL-17F humana (100 ng ml^{-1}) en presencia de una concentración fija de TNF- α humana se preincubó esta mezcla con CDP435. Se añadió después citocina más anticuerpo a las células Hela que se incubaron durante la noche. La producción de IL-6 en el sobrenadante de cultivo de células fue proporcionada a la cantidad de IL-17/IL-17F añadida a las células. Se midieron los niveles IL-6 humanos por ELISA y se cuantificaron por comparación con concentraciones clásicas conocidas de IL-6 humano.

Los datos (Figuras 8, 9 y 10) indican que CDP435 neutralizó fuertemente tanto IL-17 recombinante humana como IL-17 recombinante de mono pero no inhibió la actividad de IL-17F recombinante humana. Los datos de estos experimentos indicaron que CDP435 proporcionaron un IC_{50} de 158 ng $ml^{-1} \pm 48$ contra IL-17 recombinante humana (25 ng ml^{-1}) y 147 ng $ml^{-1} \pm 45$ contra IL-17 recombinante de mono (25 ng ml^{-1}).

Ensayo de neutralización de IL-17 de ratón (células 3T3-NIH)

Se determinó la potencia de neutralización de CDP435 contra IL-17 recombinante de ratón. Se obtuvieron células 3T3-NIH del banco de células en ATCC (ATCC CRL-1658). Se cultivaron las células en DMEM enriquecido con suero bovino al 10%, penicilina, gentamicina y glutamina. El tampón de ensayo usado fue idéntico a este tampón con suero fetal bovino reemplazando suero bovino. Se pusieron en placas 1×10^4 células en placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pozos. Se incubaron células durante la noche y se lavaron una sola vez en tampón de ensayo. Se preincubó IL-17 de murina en presencia de una concentración fija de TNF- α humana con CDP435.

Después se añadió citocina más CDP435 a las células 3T3-NIH que se incubaron durante la noche. La producción de IL-6 en el sobrenadante de cultivo de células fue proporcionada a la cantidad de IL-17 de ratón añadida a las células. Los niveles de IL-6 de ratón se midieron por ELISA y se cuantificaron por comparación con concentraciones clásicas conocidas de IL-6 de murina. Los datos indican que CDP435 no inhibió la actividad de IL-17 recombinante de ratón (Figura 11).

5

Ejemplo 6: Estudio farmacocinético en ratas con CDP435

Se inyectaron ratas s. c. con CDP435 etiquetado con ^{125}I . A diversos tiempos se extrajo sangre de los animales y se realizó recuento sanguíneo por radioactividad. Las trazas farmacocinéticas se muestran en la Figura 12. $\text{AUC}_{0-\infty} = 2.651\% \text{ dosis} \cdot \text{h}$, $t_{1/2\beta} = 52 \text{ h}$, $\text{C}_{\text{máx}} = 22,7\%$ de la dosis. Los resultados mostraron que CDP435 presentaba buena farmacocinética con una semivida de 52 horas.

10

Se etiquetó CDP435 con ^{125}I a una actividad específica de $0,07 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ y $77,6 \mu\text{g}$ de anticuerpo administrado s. c. en un volumen de $100 \mu\text{l}$.

Ensayo de neutralización in vivo

Para determinar la eficacia de la neutralización de CDP435 *in vivo*, se ensayó CDP485 en dos modelos *in vivo* de inflamación.

15

CDP435 intraperitoneal / hIL-17 intraperitoneal en ratones

Se inyectaron ratones Balb/c macho (18-25 g) por vía intraperitoneal (i. p.) con CDP435 o Fab' A33-PEG de control y se inyectaron después i. p. 5 minutos más tarde con hIL-17. Después de 180 minutos, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se realizó lavado peritoneal (3 ml de HBSS (Sales Equilibradas de Hanks) + 0,25% de BSA, HEPES 12 mM) y acumulación de neutrófilos cuantificada por FACS (los neutrófilos se identificaron como las células que expresaban CD45 y altos niveles de GR1 por teñido con anticuerpos CyChrome anti-CD45 y Ficoeritrina anti-GR1). La acumulación de neutrófilos en respuesta a 300 ng de hIL-17 se redujo significativamente con CDP435 a dosis de 0,01 y 0,1 mg/kg (Figura 13).

20

En un experimento separado se dosificaron a los animales s. c. 20 mg/kg de CDP435 y se estimularon i. p. con 300 ng de hIL-17 24 horas más tarde. Después de unas 3 horas más, el lavado peritoneal mostró que el tratamiento de CDP435 había bloqueado la acumulación de neutrófilos (Figura 14). Así CDP435 es eficaz contra hIL-17 cuando se proporciona de manera local con el antígeno o se administra s. c. en un sitio distante.

25

Listado de secuencias

<110> UCB Celltech la rama registrada de U. K. de UCB S.A.

<120> Moléculas de anticuerpo con especificidad para IL-17 humana.

<130> PA 561

<160> 23

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 357

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

```

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc      60
acatgcaccg tctcaggggt ctcattaact acctatgggtg tacactggat tcgccagcct      120
ccaggaaagg gtctggagtg gctggtagtg atttggagtg atggatacac aacctataat      180
tcagctctca aatccagact gagcatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttctta      240
aaaatgaaca gtctccaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag aaatgatggt      300
gactacttct attctatgga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca      357
    
```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

```

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
          20           25           30

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

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

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65           70           75           80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
    
```

ES 2 456 669 T3

85 90 95

Arg Asn Asp Gly Asp Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 3
 gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc 60
 ttctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcagga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgtacg 339

<210> 4
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

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

Asp Gln Ala Ser Phe Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

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

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

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

ES 2 456 669 T3

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

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

<400> 5

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

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

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

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

Asn Asp Gly Asp Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 9

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

ES 2 456 669 T3

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Thr
 1 5

<210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> gH11

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Arg Asn Asp Gly Asp Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 456 669 T3

<220>

<223> gH11

<400> 12

```
gaggttcagc tggtcgagtc tggaggcggg gttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc      60
tcttgtgcag ttagcggcctt ctcatctaac acctatgggtg tacactgggtg gcggcaggca    120
cctgggaagg gcctggagtg ggtggccgtg atttggagtg atggatacac aacctataat      180
tcagctctca aatcccgttt caccatttcc cgcgacaatt ctaagaacac cgtttacctc      240
cagatgaact ctctccgcgc agaggacaca gcagtctatt actgtgcacg gaatgatggt      300
gactacttct attctatgga ctactgggga caggggaccc ttgtgacagt ctcgagt          357
```

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> gL3

<400> 13

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

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20           25           30
```

```
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
35           40           45
```

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

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

```
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85           90           95
```

```
Thr His Val Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100          105          110
```

<210> 14

<211> 336

<212> ADN

ES 2 456 669 T3

<213> Artificial

<220>

<223> gL3

<400> 14

gatgtgcaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact	60
attacctgta gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg	120
tatcagcaaa aaccgggcaa agccccgaag ctgctcatct ataaagtttc caaccgattt	180
tctgggtgag catctcggtt cagtggcagt ggcagcggta ccgactttac cctcacaatt	240
tcgtctctcc agccggaaga tttcgccact tactattggt ctcaaagtac acatgttccg	300
acgttcgggtc agggcactaa agtagaaatc aaacgt	336

<210> 15

<211> 672

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CDP435 Cadena pesada

<400> 15

gaggttcagc tggctgagtc tggaggcggg gttgtccagc ctggagggag cctgcgtctc	60
tcttgtgcag ttagcggctt ctcatnaact acctatggtg tacactgggt gcggcaggca	120
cctgggaagg gcctggagtg ggtggccgtg atttggagtg atggatacac aacctataat	180
tcagctctca aatcccgttt caccatttcc cgcgacaatt ctaagaacac cgtttacctc	240
cagatgaact ctctccgcgc agaggacaca gcagtctatt actgtgcacg gaatgatggt	300
gactacttct attctatgga ctactgggga caggggacct ttgtgacagt ctcgagtgct	360
tctacaaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga	540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggctc acaagaaagt tgagcccaaa	660
tcttgtaaat ga	672

<210> 16

<211> 222

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 456 669 T3

<223> CDP435 Cadena pesada

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Arg Asn Asp Gly Asp Tyr Phe Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 456 669 T3

<210> 17
 <211> 657
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDP435 Cadena ligera

<400> 17
 gatgtgcaga tgaccagag tccaagcagt ctctccgcca gcgtaggcga tcgtgtgact 60
 attacctgta gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
 tatcagcaaa aaccgggcaa agccccgaag ctgctcatct ataaagtttc caaccgattt 180
 tctgggtgtgc catctcgttt cagtggcagt ggcagcggta ccgactttac cctcacaatt 240
 tcgtctctcc agccggaaga tttcgccact tactattggt ctcaaagtac acatgttccg 300
 acgttcggtc agggcactaa agtagaaatc aaacgtacgg tagcggcccc atctgtcttc 360
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgccaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc accagtaaca aaaagtttta atagagggga gtgttaa 657

<210> 18
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDP435 cadena ligera

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

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

ES 2 456 669 T3

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

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

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

- <210> 19
- <211> 1516
- <212> ADN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> CDP435 cadena Pesada y Ligera en pTTOD

<400> 19
atgaaaaaga cagctatcgc aattgcagtg gccttggctg gtttcgctac cgtagcgcaa 60
gctgatgtgc agatgaccca gagtccaagc agtctctccg ccagcgtagg cgatcgtgtg 120
actattacct gtagatctag tcagagcctt gtacacagta atggaaacac ctattttacat 180
tggtatcagc aaaaaccggg caaagccccg aagctgctca tctataaagt ttccaaccga 240
ttttctggtg tgccatctcg tttcagtggc agtggcagcg gtaccgactt taccctcaca 300

ES 2 456 669 T3

atttcgtctc tccagccgga agatttcgcc acttactatt gttctcaaag tacacatggt 360
 ccgacgttcg gtcagggcac taaagtagaa atcaaacgta cggtagcggc cccatctgtc 420
 ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540
 tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
 agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660
 gtcacccatc agggcctgag ctaccagta acaaaaagtt ttaatagagg ggagtgttaa 720
 aatgaagaag actgctatag caattgcagt ggcgctagct ggtttcgcca ccgtggcgca 780
 agctgagggt cagctggctg agtctggagg cggggttgtc cagcctggag ggagcctgcg 840
 tctctcttgt gcagttagcg gcttctcatt aactacctat ggtgtacact ggggtcggca 900
 ggcacctggg aagggcctgg agtgggtggc cgtgatttgg agtgatggat acacaaccta 960
 taattcagct ctcaaattccc gtttcacat ttcccgcgac aattctaaga acaccgttta 1020
 cctccagatg aactctctcc gcgcagagga cacagcagtc tattactgtg cacggaatga 1080
 tgaggtctac ttgagagagg cgcgtctcct gtgtcgtcag ataatgacac gtgccttact 1140
 aggtgactac ttctattcta tggactactg gggacagggg acccttgtga cagtctcgag 1200
 tgcttctaca aagggcccat cggctctccc cctggcaccg tcctccaaga gcacctctgg 1260
 gggcacagcg gccctgggct gcctgggcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc 1320
 gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc 1380
 aggactctac tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac 1440
 ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtcgacaaga aagttgagcc 1500
 caaatcttgt taatga 1516

<210> 20
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

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

ES 2 456 669 T3

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

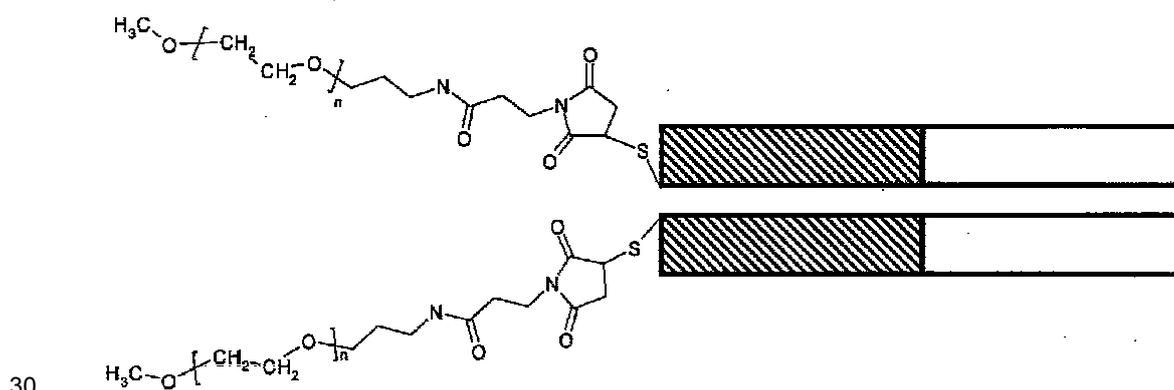
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, con una cadena pesada que comprende la secuencia gH11 (SEC ID N°: 11) y una cadena ligera que comprende la secuencia gL3 (SEC ID N°: 13).
- 5 2. Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, con una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 2 y una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 4.
3. Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, con una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 18.
- 10 4. Un anticuerpo neutralizante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 -3 a que se une una o más moléculas efectoras o informadoras.
5. Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para IL-17 humana, con una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 18 y a que se unen dos moléculas efectoras.
- 15 6. Un anticuerpo neutralizante según la reivindicación 5, en el que una molécula efectora se une a la cisteína intercadena de C_L y una molécula efectora se une a la cisteína intercadena de C_H1 .
7. El anticuerpo según la reivindicación 6, donde la cisteína intercadena de C_L está en la posición 214 de la cadena ligera (por numeración Kabat) y la cisteína intercadena de C_H1 está en la posición 233 de la cadena pesada (por numeración Kabat).
- 20 8. El anticuerpo según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde la cisteína intercadena de C_L está en la posición 218 de la cadena ligera (por numeración secuencial) y la cisteína intercadena de C_H1 está en la posición 222 de la cadena pesada (por numeración secuencial).
9. Un anticuerpo neutralizante según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en el que la molécula efectora comprende uno o más polímeros.
- 25 10. Un anticuerpo neutralizante según la reivindicación 9, en el que uno o más polímeros es/son un metoxipoli(etilenglicol) o poli(etilenglicol).
11. Un anticuerpo neutralizante según la reivindicación 10, que tiene la estructura:



donde n está entre 400 y 520.

12. Una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena o las cadenas pesadas y/o ligeras de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 35 13. Un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN según la reivindicación 12.
14. Un vector según la reivindicación 13, en el que el vector comprende la secuencia proporcionada en la SEC ID N°: 19.
15. Una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión según la reivindicación 13 o la

reivindicación 14.

16. Un procedimiento para la producción del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 15 y aislar el anticuerpo.

5 17. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, junto con uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

18. Una composición farmacéutica según la reivindicación 17, que comprende adicionalmente otros ingredientes activos.

10 19. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una composición farmacéutica según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, para uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado a infección, artritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria pélvica, Enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Crohn, Enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, colecistopatía, Enfermedad pilonidal, peritonitis, soriasis, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, apoplejía, Diabetes Tipo I, artritis de Lyme, meningocelalitis, trastornos inflamatorios mediados inmunitarios del sistema nervioso central y periférico, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, trauma (cirugía), enfermedad del injerto contra el hospedador, rechazo de trasplantes, 15 cáncer, enfermedad cardíaca, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, periodontitis, hipoclorhidia y dolor.

Figura 1
(a)

```

          10          20          30          40
ATG GCT GTC CTA GGG CTG CTC TTC TGC CTG GTG ACT TTC CCA
TAC CGA CAG GAT CCC GAC GAG AAG ACG GAC CAC TGA AAG GGT
M  A  V  L  G  L  L  F  C  L  V  T  F  P>

          50          60          70          80
AGC TGT GTC CTG TCC CAG GTG CAG CTG AAG GAG TCA GGA CCT
TCG ACA CAG GAC AGG GTC CAC GTC GAC TTC CTC AGT CCT GGA
S  C  V  L  S  Q  V  Q  L  K  E  S  G  P>

          90          100          110          120
GGC CTG GTG GCG CCC TCA CAG AGC CTG TCC ATC ACA TGC ACC
CCG GAC CAC CGC GGG AGT GTC TCG GAC AGG TAG TGT ACG TGG
G  L  V  A  P  S  Q  S  L  S  I  T  C  T>

          130          140          150          160
GTC TCA GGG TTC TCA TTA ACT ACC TAT GGT GTA CAC TGG ATT
CAG AGT CCC AAG AGT AAT TGA TGG ATA CCA CAT GTG ACC TAA
V  S  G  F  S  L  T  T  Y  G  V  H  W  I>

170          180          190          200          210
CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGT CTG GAG TGG CTG GTA GTG ATT
GCG GTC GGA GGT CCT TTC CCA GAC CTC ACC GAC CAT CAC TAA
R  Q  P  P  G  K  G  L  E  W  L  V  V  I>

          220          230          240          250
TGG AGT GAT GGA TAC ACA ACC TAT AAT TCA GCT CTC AAA TCC
ACC TCA CTA CCT ATG TGT TGG ATA TTA AGT CGA GAG TTT AGG
W  S  D  G  Y  T  T  Y  N  S  A  L  K  S>

          260          270          280          290
AGA CTG AGC ATC ACC AAG GAC AAC TCC AAG AGC CAA GTT TTC
TCT GAC TCG TAG TGG TTC CTG TTG AGG TTC TCG GTT CAA AAG
R  L  S  I  T  K  D  N  S  K  S  Q  V  F>

          300          310          320          330
TTA AAA ATG AAC AGT CTC CAA ACT GAT GAC ACA GCC ATG TAC
AAT TTT TAC TTG TCA GAG GTT TGA CTA CTG TGT CGG TAC ATG
L  K  M  N  S  L  Q  T  D  D  T  A  M  Y>

          340          350          360          370
TAC TGT GCC AGA AAT GAT GGT GAC TAC TTC TAT TCT ATG GAC
ATG ACA CGG TCT TTA CTA CCA CTG ATG AAG ATA AGA TAC CTG
Y  C  A  R  N  D  G  D  Y  F  Y  S  M  D>

380          390          400          410
TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA
ATG ACC CCA GTT CCT TGG AGT CAG TGG CAG AGG AGT
Y  W  G  Q  G  T  S  V  T  V  S  S>

```

(b)

```

          10          20          30          40
ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTG ATG TTC TGG ATT
TAC TTC AAC GGA CAA TCC GAC AAC CAC GAC TAC AAG ACC TAA
M K L P V R L L V L M F W I>

          50          60          70          80
CCT GCT TCC AGC AGT GAT GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC
GGA CGA AGG TCG TCA CTA CAA CAC TAC TGG GTT TGA GGT GAG
P A S S S D V V M T Q T P L>

          90          100          110          120
TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA GAT CAA GCC TCC TTC TCT TGC
AGG GAC GGA CAG TCA GAA CCT CTA GTT CGG AGG AAG AGA ACG
S L P V S L G D Q A S F S C>

          130          140          150          160
AGA TCT AGT CAG AGC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT
TCT AGA TCA GTC TCG GAA CAT GTG TCA TTA CCT TTG TGG ATA
R S S Q S L V H S N G N T Y>

170          180          190          200          210
TTA CAT TGG TAC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC
AAT GTA ACC ATG GAC GTC TTC GGT CCG GTC AGA GGT TTC GAG
L H W Y L Q K P G Q S P K L>

          220          230          240          250
CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGG GTC CCA GAC
GAC TAG ATG TTT CAA AGG TTG GCT AAA AGA CCC CAG GGT CTG
L I Y K V S N R F S G V P D>

          260          270          280          290
AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC AAG
TCC AAG TCA CCG TCA CCC AGT CCC TGT CTA AAG TGT GAG TTC
R F S G S G S G T D F T L K>

          300          310          320          330
ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC
TAG TCG TCT CAC CTC CGA CTC CTA GAC CCT CAA ATA AAG ACG
I S R V E A E D L G V Y F C>

          340          350          360          370
TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG
AGA GTT TCA TGT GTA CAA GGC TGC AAG CCA CCT CCG TGG TTC
S Q S T H V P T F G G G T K>

380          390
CTG GAA ATC AAA CGT ACG
GAC CTT TAG TTT GCA TGC
L E I K R T>

```


Figura 3

(a)

```

                10          20          30          40          50
ATG AAG AAG ACT GCT ATA GCA ATT GCA GTG GCG CTA GCT GGT TTC GCC ACC GTG
TAC TTC TTC TGA CGA TAT CGT TAA CGT CAC CGC GAT CGA CCA AAG CGG TGG CAC
M K K T A I A I A V A L A G F A T V>

                60          70          80          90          100
GCG CAA GCT GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG GTT GTC CAG CCT GGA
CGC GTT CGA CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC CAA CAG GTC GGA CCT
A Q A E V Q L V E S G G G V V Q P G>

110          120          130          140          150          160
GGG AGC CTG CGT CTC TCT TGT GCA GTT AGC GGC TTC TCA TTA ACT ACC TAT GGT
CCC TCG GAC GCA GAG AGA ACA CGT CAA TCG CCG AAG AGT AAT TGA TGG ATA CCA
G S L R L S C A V S G F S L T T Y G>

                170          180          190          200          210
GTA CAC TGG GTG CGG CAG GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCC GTG ATT
CAT GTG ACC CAC GCC GTC CGT GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGG CAC TAA
V H W V R Q A P G K G L E W V A V I>

                220          230          240          250          260          270
TGG AGT GAT GGA TAC ACA ACC TAT AAT TCA GCT CTC AAA TCC CGT TTC ACC ATT
ACC TCA CTA CCT ATG TGT TGG ATA TTA AGT CGA GAG TTT AGG GCA AAG TGG TAA
W S D G Y T T Y N S A L K S R F T I>

                280          290          300          310          320
TCC CGC GAC AAT TCT AAG AAC ACC GTT TAC CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA
AGG GCG CTG TTA AGA TTC TTG TGG CAA ATG GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT
S R D N S K N T V Y L Q M N S L R A>

                330          340          350          360          370
GAG GAC ACA GCA GTC TAT TAC TGT GCA CGG AAT GAT GGT GAC TAC TTC TAT TCT
CTC CTG TGT CGT CAG ATA ATG ACA CGT GCC TTA CTA CCA CTG ATG AAG ATA AGA
E D T A V Y Y C A R N D G D Y F Y S>

380          390          400          410          420
ATG GAC TAC TGG GGA CAG GGG ACC CTT GTG ACA GTC TCG AGT
TAC CTG ATG ACC CCT GTC CCC TGG GAA CAC TGT CAG AGC TCA
M D Y W G Q G T L V T V S S>
    
```

(b)

```

                10          20          30          40          50
ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT GCA GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA
TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA CGT CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT
M K K T A I A I A V A L A G F A T V>

                60          70          80          90          100
GCG CAA GCT GAT GTG CAG ATG ACC CAG AGT CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA
CGC GTT CGA CTA CAC GTC TAC TGG GTC TCA GGT TCG TCA GAG AGG CGG TCG CAT
A Q A D V Q M T Q S P S S L S A S V>

110          120          130          140          150          160
GGC GAT CGT GTG ACT ATT ACC TGT AGA TCT AGT CAG AGC CTT GTA CAC AGT AAT
CCG CTA GCA CAC TGA TAA TGG ACA TCT AGA TCA GTC TCG GAA CAT GTG TCA TTA
G D R V T I T C R S S Q S L V H S N>

                170          180          190          200          210
GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TAT CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC CCG AAG CTG
CCT TTG TGG ATA AAT GTA ACC ATA GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG GGC TTC GAC
G N T Y L H W Y Q Q K P G K A P K L>
    
```

ES 2 456 669 T3

```

    220          230          240          250          260          270
CTC ATC TAT AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT GGT GTG CCA TCT CGT TTC AGT GGC
GAG TAG ATA TTT CAA AGG TTG GCT AAA AGA CCA CAC GGT AGA GCA AAG TCA CCG
L   I   Y   K   V   S   N   R   F   S   G   V   P   S   R   F   S   G>

          280          290          300          310          320
AGT GGC AGC GGT ACC GAC TTT ACC CTC ACA ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT
TCA CCG TCG CCA TGG CTG AAA TGG GAG TGT TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA
S   G   S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D>

    330          340          350          360          370
TTC GCC ACT TAC TAT TGT TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCG ACG TTC GGT CAG GGC
AAG CGG TGA ATG ATA ACA AGA GTT TCA TGT GTA CAA GGC TGC AAG CCA GTC CCG
F   A   T   Y   Y   C   S   Q   S   T   H   V   P   T   F   G   Q   G>

380          390
ACT AAA GTA GAA ATC AAA CGT
TGA TTT CAT CTT TAG TTT GCA
T   K   V   E   I   K   R>

```

Figura 4

(a)

DVQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

(b)

EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAVSGFSLTTYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWSDGYYTYSALK
SRFTISRDNKNTVYLMNSLR AEDTAVYYCARNDGDYFYSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC*

Figura 5

```

10      20      30      40      50      60
ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCA ATT GCA GTG GCC TTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAA
TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGT TAA CGT CAC CGG AAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CGC GTT
M   K   K   T   A   I   A   I   A   V   A   L   A   G   F   A   T   V   A   Q>

70      80      90      100     110     120
GCT GAT GTG CAG ATG ACC CAG AGT CCA AGC AGT CTC TCC GCC AGC GTA GGC GAT CGT GTG
CGA CTA CAC GTC TAC TGG GTC TCA GGT TCG TCA GAG AGG CGG TCG CAT CCG CTA GCA CAC
A   D   V   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R   V>

130     140     150     160     170     180
ACT ATT ACC TGT AGA TCT AGT CAG AGC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT
TGA TAA TGG ACA TCT AGA TCA GTC TCG GAA CAT GTG TCA TTA CCT TTG TGG ATA AAT GTA
T   I   T   C   R   S   S   Q   S   L   V   H   S   N   G   N   T   Y   L   H>

190     200     210     220     230     240
TGG TAT CAG CAA AAA CCG GGC AAA GCC CCG AAG CTG CTC ATC TAT AAA GTT TCC AAC CGA
ACC ATA GTC GTT TTT GGC CCG TTT CGG GGC TTC GAC GAG TAG ATA TTT CAA AGG TTG GCT
W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   K   V   S   N   R>

250     260     270     280     290     300
TTT TCT GGT GTG CCA TCT CGT TTC AGT GGC AGT GGC AGC GGT ACC GAC TTT ACC CTC ACA
AAA AGA CCA CAC GGT AGA GCA AAG TCA CCG TCA CCG TCG CCA TGG CTG AAA TGG GAG TGT
F   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T   L   T>

310     320     330     340     350     360
ATT TCG TCT CTC CAG CCG GAA GAT TTC GCC ACT TAC TAT TGT TCT CAA AGT ACA CAT GTT
TAA AGC AGA GAG GTC GGC CTT CTA AAG CGG TGA ATG ATA ACA AGA GTT TCA TGT GTA CAA
I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   Y   C   S   Q   S   T   H   V>

370     380     390     400     410     420
CCG ACG TTC GGT CAG GGC ACT AAA GTA GAA ATC AAA CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC
GGC TGC AAG CCA GTC CCG TGA TTT CAT CTT TAG TTT GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG
P   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K   R   T   V   A   A   P   S   V>

430     440     450     460     470     480
TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG
AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC
F   I   F   P   P   S   D   E   Q   L   K   S   G   T   A   S   V   V   C   L>

490     500     510     520     530     540
CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA
GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT
L   N   N   F   Y   P   R   E   A   K   V   Q   W   K   V   D   N   A   L   Q>

550     560     570     580     590     600
TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC
AGC CCA TTG AGG GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG
S   G   N   S   Q   E   S   V   T   E   Q   D   S   K   D   S   T   Y   S   L>

610     620     630     640     650     660
AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA
TCG TCG TGG GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG CGG ACG CTT
S   S   T   L   T   L   S   K   A   D   Y   E   K   H   K   V   Y   A   C   E>

670     680     690     700     710     720
GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCA CCA GTA ACA AAA AGT TTT AAT AGA GGG GAG TGT TAA
CAG TGG GTA GTC CCG GAC TCG AGT GGT CAT TGT TTT TCA AAA TTA TCT CCC CTC ACA ATT
V   T   H   Q   G   L   S   S   P   V   T   K   S   F   N   R   G   E   C   *>

730     740     750     760     770     780
A ATG AAG AAG ACT GCT ATA GCA ATT GCA GTG GCG CTA GCT GGT TTC GCC ACC GTG GCG CAA
T TAC TTC TTC TGA CGA TAT CGT TAA CGT CAC CGC GAT CGA CCA AAG CGG TGG CAC CGC GTT
M   K   K   T   A   I   A   I   A   V   A   L   A   G   F   A   T   V   A   Q>

790     800     810     820     830     840
GCT GAG GTT CAG CTG GTC GAG TCT GGA GGC GGG GTT GTC CAG CCT GGA GGG AGC CTG CGT

```

ES 2 456 669 T3

CGA CTC CAA GTC GAC CAG CTC AGA CCT CCG CCC CAA CAG GTC GGA CCT CCC TCG GAC GCA
A E V Q L V E S G G G V V Q P G G S L R>

850 860 870 880 890 900
CTC TCT TGT GCA GTT AGC GGC TTC TCA TTA ACT ACC TAT GGT GTA CAC TGG GTG CGG CAG
GAG AGA ACA CGT CAA TCG CCG AAG AGT AAT TGA TGG ATA CCA CAT GTG ACC CAC GCC GTC
L S C A V S G F S L T T Y G V H W V R Q>

910 920 930 940 950 960
GCA CCT GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTG GCC GTG ATT TGG AGT GAT GGA TAC ACA ACC TAT
CGT GGA CCC TTC CCG GAC CTC ACC CAC CGG CAC TAA ACC TCA CTA CCT ATG TGT TGG ATA
A P G K G L E W V A V I W S D G Y T T Y>

970 980 990 1000 1010 1020
AAT TCA GCT CTC AAA TCC CGT TTC ACC ATT TCC CGC GAC AAT TCT AAG AAC ACC GTT TAC
TTA AGT CGA GAG TTT AGG GCA AAG TGG TAA AGG GCG CTG TTA AGA TTC TTG TGG CAA ATG
N S A L K S R F T I S R D N S K N T V Y>

1030 1040 1050 1060 1070 1080
CTC CAG ATG AAC TCT CTC CGC GCA GAG GAC ACA GCA GTC TAT TAC TGT GCA CGG AAT GAT
GAG GTC TAC TTG AGA GAG GCG CGT CTC CTG TGT CGT CAG ATA ATG ACA CGT GCC TTA CTA
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N D>

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GGT GAC TAC TTC TAT TCT ATG GAC TAC TGG GGA CAG GGG ACC CTT GTG ACA GTC TCG AGT
CCA CTG ATG AAG ATA AGA TAC CTG ATG ACC CCT GTC CCC TGG GAA CAC TGT CAG AGC TCA
G D Y F Y S M D Y W G Q G T L V T V S S>

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG
CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGC CAG AAG GGG GAC CGT GGG AGG AGG TTC TCG TGG AGA CCC
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G>

1210 1220 1230 1240 1250 1260
GGC ACA GCG GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG
CCG TGT CCG CGG GAC CCG ACG GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC
G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S>

1270 1280 1290 1300 1310 1320
TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA
ACC TTG AGT CCG CGG GAC TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S>

1330 1340 1350 1360 1370 1380
GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC
CCT GAG ATG AGG GAG TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGG GTC TGG
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T>

1390 1400 1410 1420 1430 1440
TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTC GAC AAG AAA GTT GAG CCC
ATG TAG ACG TTG CAC TTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC CAG CTG TTC TTT CAA CTC GGG
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P>

1450
AAA TCT TGT TAA TGA
TTT AGA ACA ATT ACT
K S C * *>

Figura 6

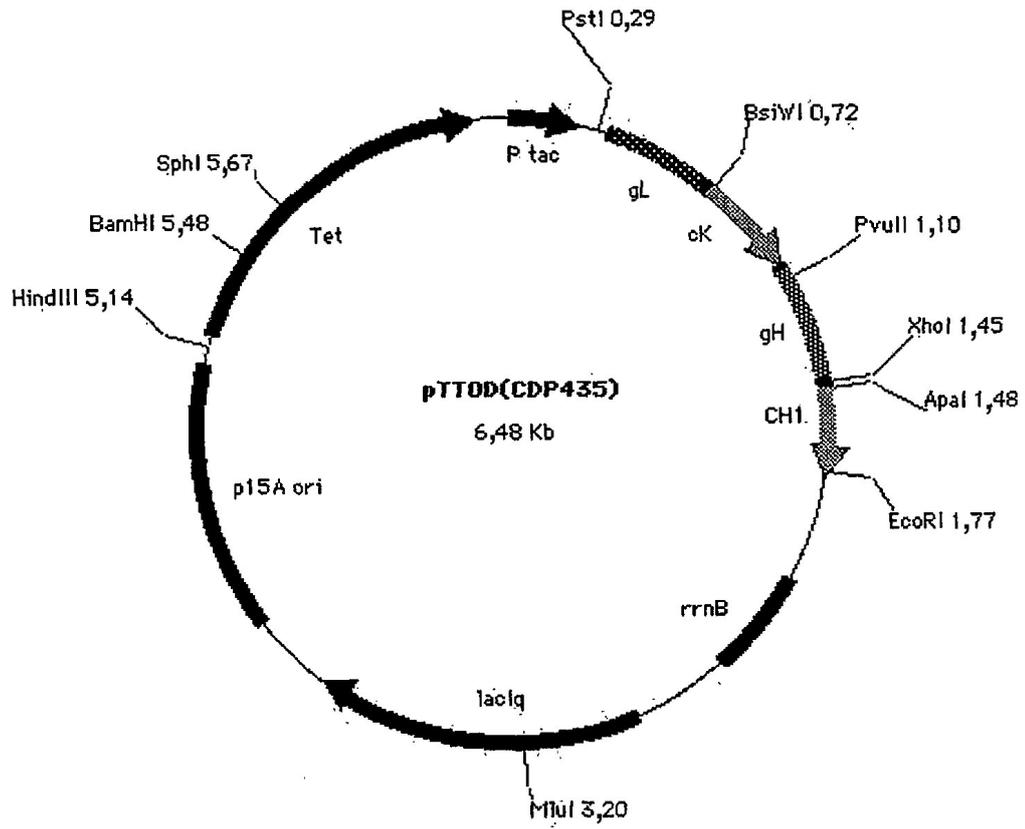


Figura 7

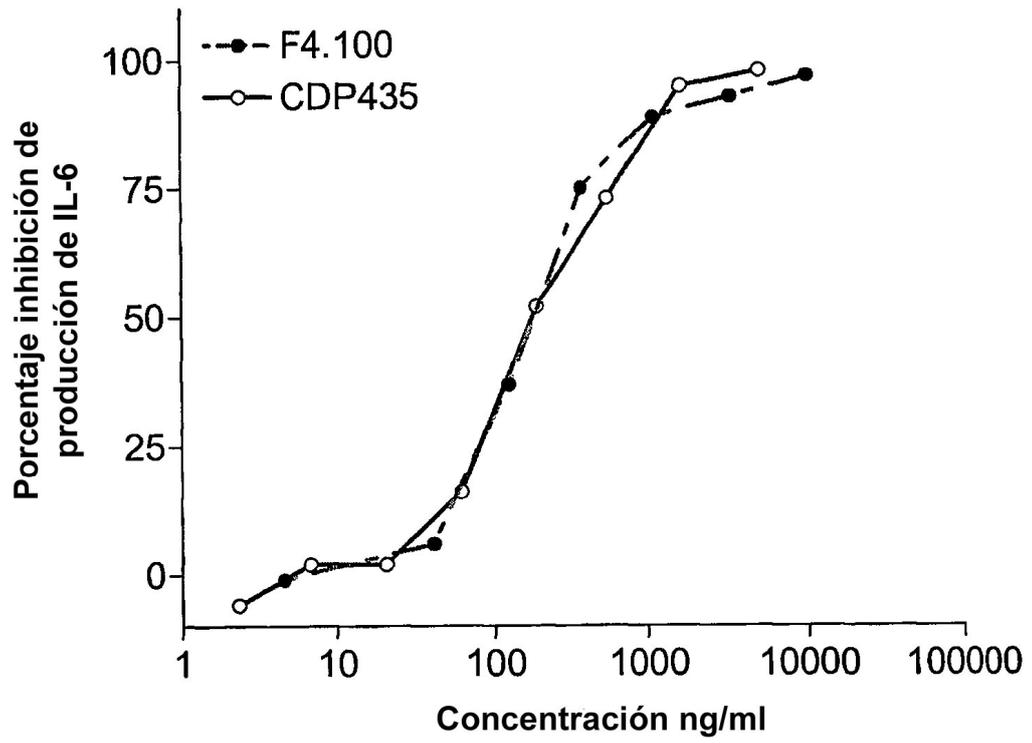


Figura 8

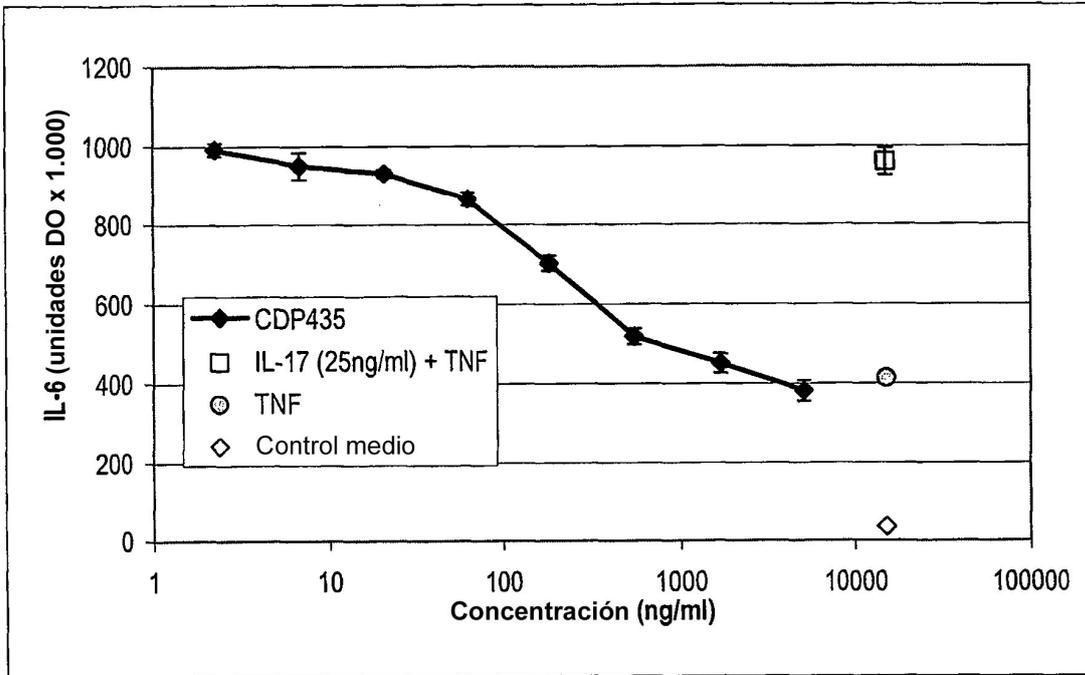


Figura 9

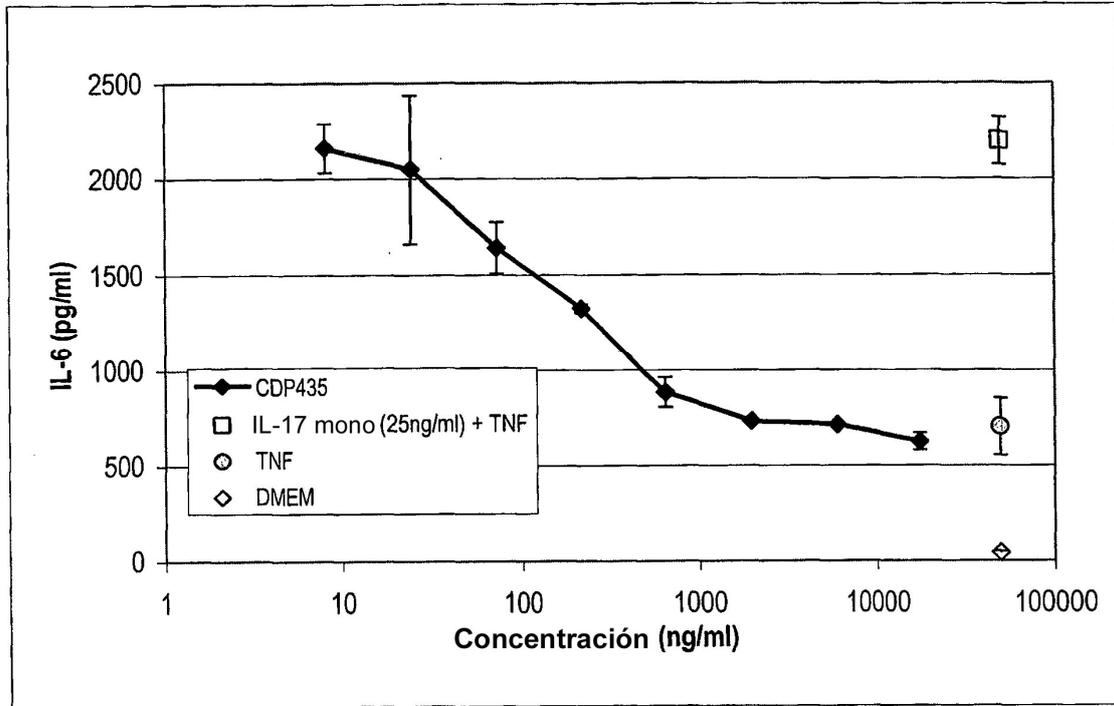


Figura 10

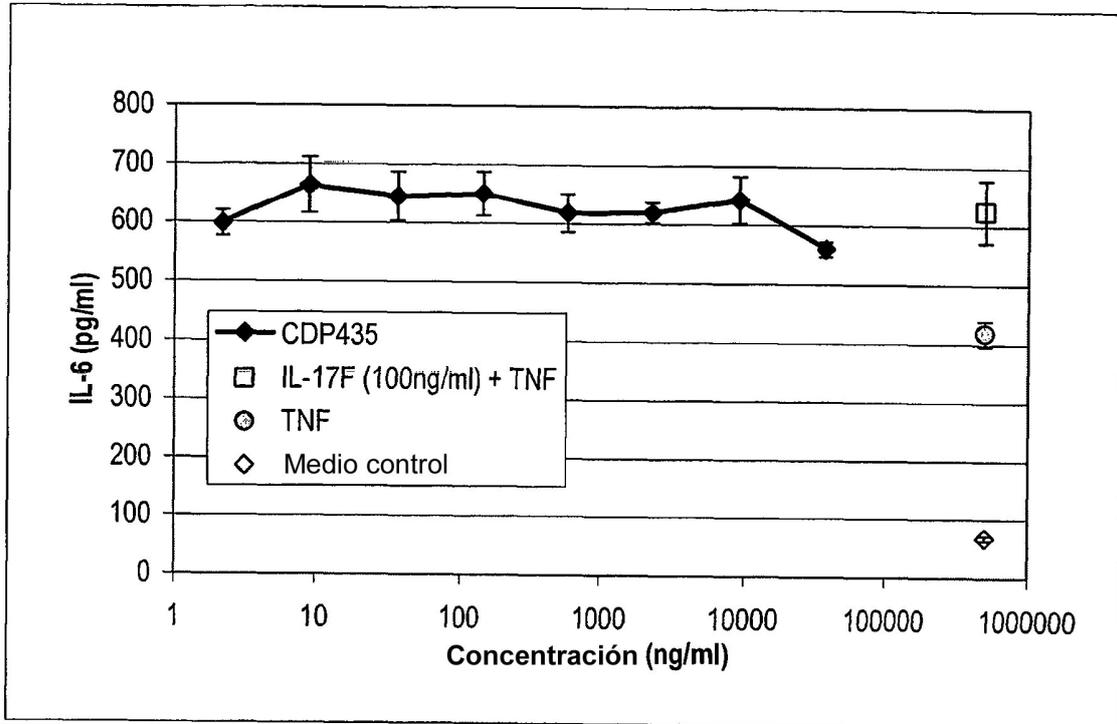


Figura 11

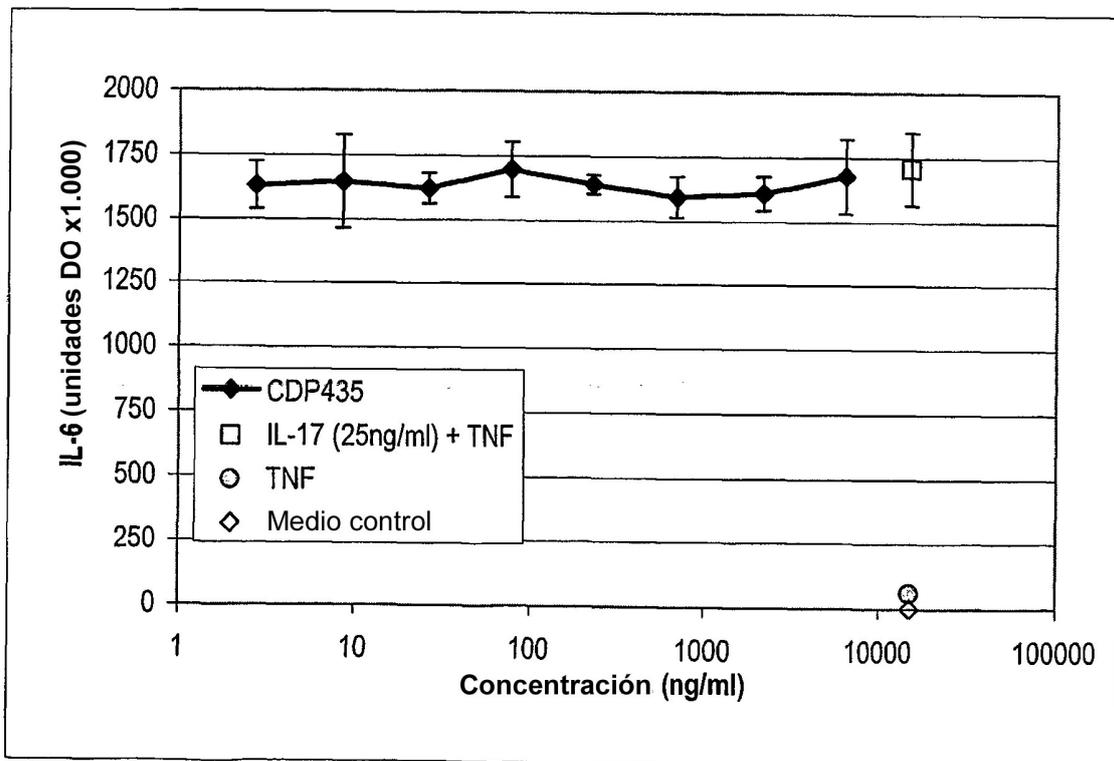
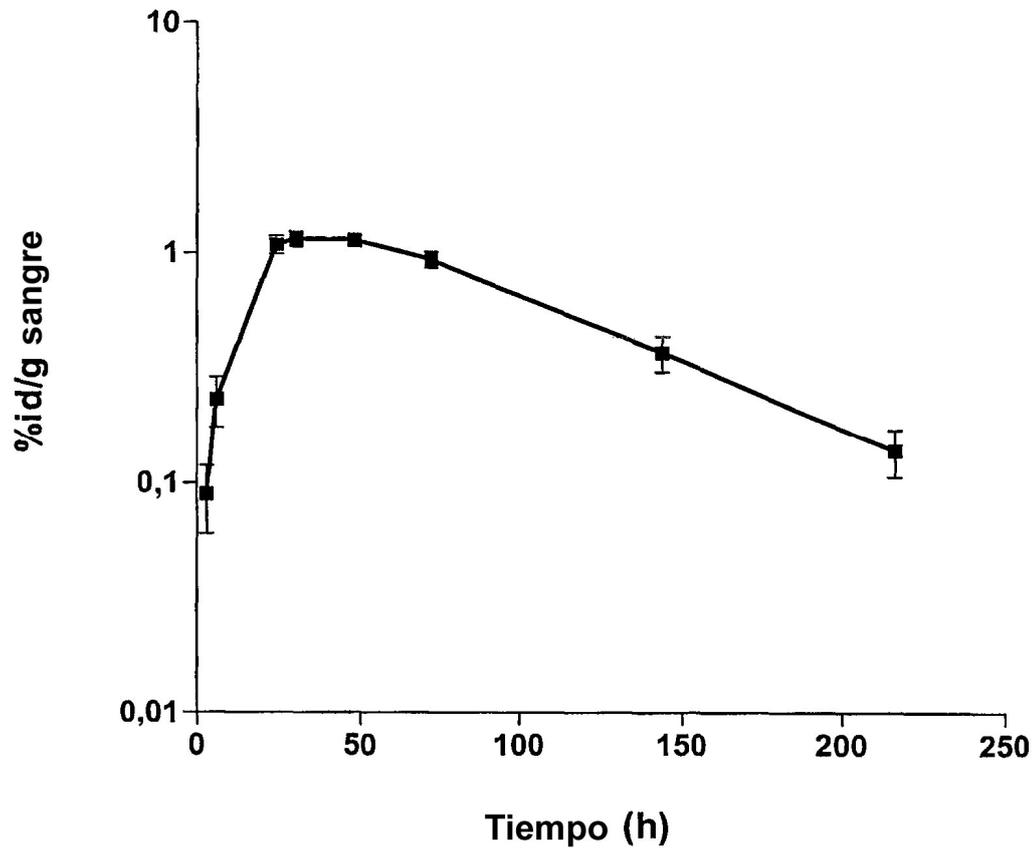


Figura 12

**Datos farmacocinéticos**

AUC (0-∞) (%dosis*h)	2469 ± 4,40
absorción t1/2 (h)	27,5 ± 15,9
t1/2β (h)	30,6 ± 13,0
Cmáx (%dosis)	21,6 ± 6,30

Figura 13

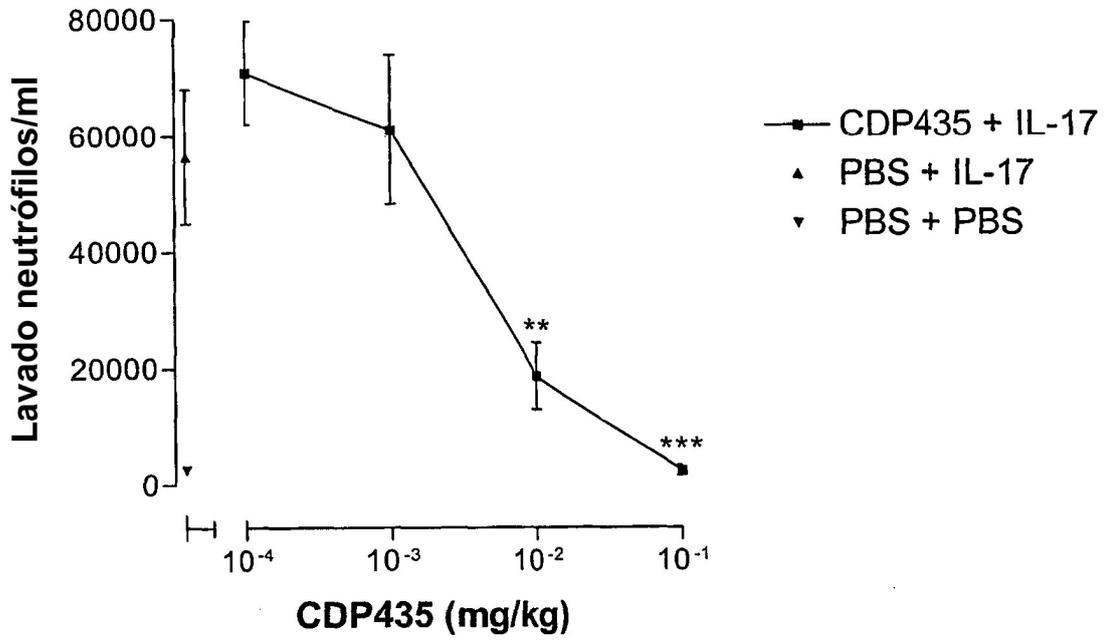


Figura 14

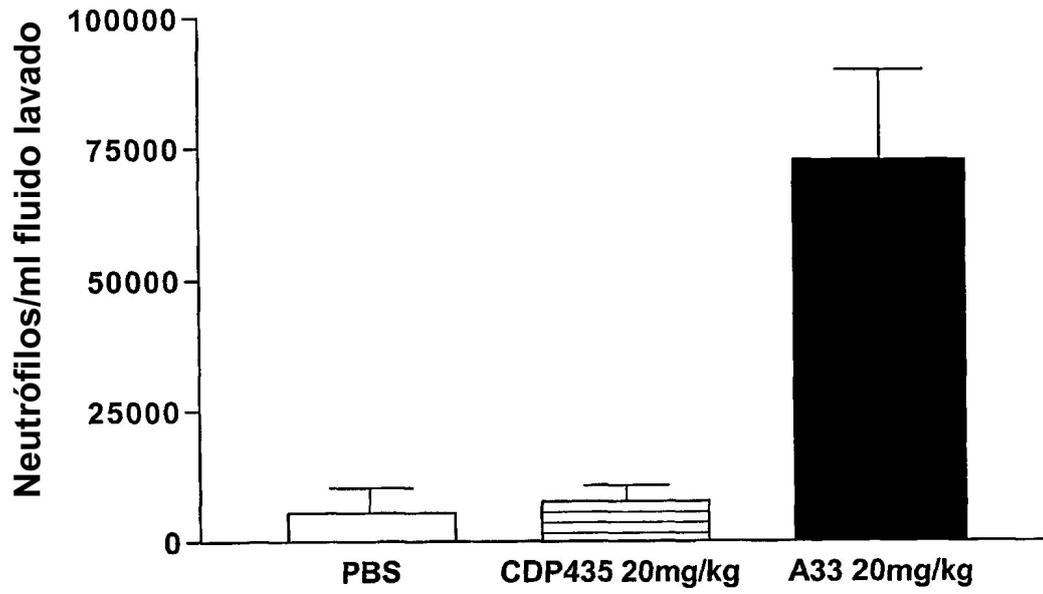
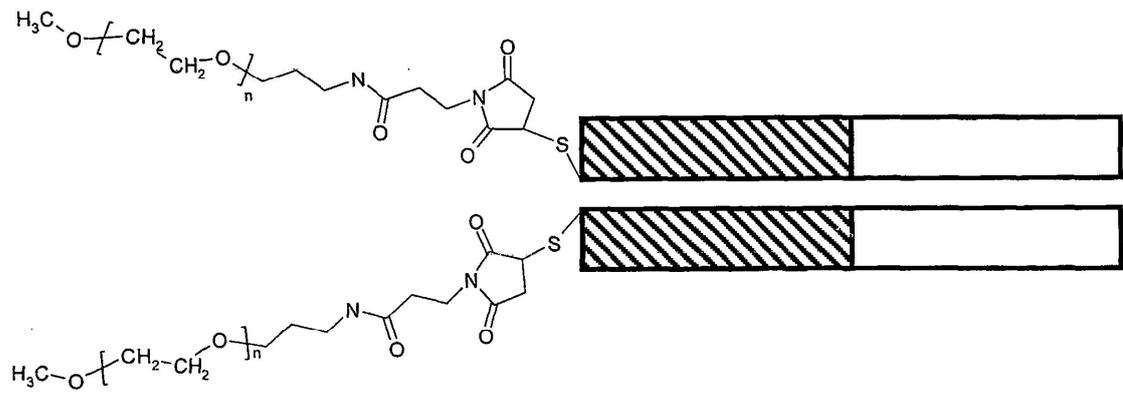


Figura 15



n está entre 400 y 520