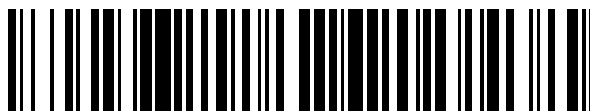


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 482**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 5/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2007 E 07761460 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2014 EP 2142568**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a IL-17a y a IL-17f y procedimientos de uso de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2014

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WASHINGTON 98102, US**

72 Inventor/es:

**JASPERS, STEPHEN, R.;
PRESNELL, SCOTT, R. y
HUBER, MONICA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 463 482 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 que se unen a IL-17a y a IL-17f y procedimientos de uso de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, a la identificación y aislamiento de anticuerpos que se unen a IL-17A y a IL-17F y a procedimientos de uso los mismos.

Antecedentes de la invención

Se han identificado seis miembros de la familia de la IL-17 en base a su similitud con el miembro prototípico de la familia, originalmente identificada como IL-17 y que ahora se denomina IL-17A. Véase, por ejemplo, Spriggs, M. K. "Interleukin-17 and its receptor" J Clin. Immunol. 17:366 - 369 (1997). Los otros miembros de la familia son IL-17B, 10 IL-17C, IL-17D, IL-17E (también conocida como IL-25) e IL-17F. Véase, por ejemplo, Kawaguchi y col., "IL-17 cytokine family", J Allergy Clin. Immunol. 114: 1265 - 1273 (2004); Kolls and Linden, "Interleukin-17 family members and inflammation", Immunity 21:467 - 476 (2004) y Moseley y col., "Interleukin-17 family and IL-17 receptors", Cytokine Growth Factor Rev 14:155 - 174 (2003). Entre los miembros de la familia, la IL-17A y la IL-17F son, con 15 mucho, los más similares entre sí y comparten una identidad del 55% (Kolls and Linden, 2004). Además de su similitud de secuencia, estas dos citocinas parecen estar producidas por tipos de células similares, principalmente los linfocitos T CD4+ de memoria activados. Véase, por ejemplo, Agarwal y col., "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17" J. Biol. Chem. 278:1910 - 191 (2003); véase también Langrish y col., "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation" J. Exp. Med. 201: 233 - 240 (2005); y Starnes y col., "Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in 20 activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production" J. Immunol. 167:4137 - 4140 (2001).

El documento WO2005/010044 divulga un anticuerpo que se une a un heterodímero IL-17A/IL-17F. No existen divulgaciones de un anticuerpo que se une tanto a IL-17A como a IL-17F.

25 El documento WO2006/088833 y Wright y col., (J. Biol. Chem., 282, 13447 - 13455, 2007) divulgan anticuerpos frente a IL-17F. No existen pruebas que demuestren que un anticuerpo se une tanto a IL-17F como a IL-17A.

Además, ambos están implicados de un modo similar como agentes contribuyentes a la progresión y patología de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes y en modelos de ratón de enfermedades humanas. Específicamente, la IL-17A y la IL-17F se han implicado como citocinas efectoras principales que desencadenan 30 respuestas inflamatorias y, de este modo, contribuyen a una serie de enfermedades autoinflamatorias, incluidas esclerosis múltiple, artritis reumatoide y enfermedades intestinales inflamatorias.

Las actividades demostradas *in vivo* de IL-17A y la IL-17F ilustran el potencial clínico o terapéutico, y la necesidad, de antagonistas de IL-17A y la IL-17F. Específicamente, los anticuerpos que se unen a IL-17A y a IL-17F que 35 inhiben (anticuerpos antagonistas) las actividades inmunológicas de la IL-17A y la IL-17F poseerían dichas nuevas cualidades terapéuticas. Por tanto, sigue habiendo la necesidad en la técnica de un antagonista de la IL-17A y de la IL-17F.

Breve descripción de las figuras

La Figura muestra una curva de unión representativa generada mediante el programa de software Prizm.

Descripción detallada de la invención

Las citocinas proinflamatorias IL-17A y IL-17F tienen un alto grado de similitud de frecuencia, comparten muchas 40 propiedades biológicas y ambas son producidas por los linfocitos T activados. Ambas se han implicado como factores que contribuyen a la progresión de varias enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide y asma. De hecho, los reactivos que anulan la función de la IL-17A mejoran significativamente la incidencia y la gravedad de la enfermedad en varios modelos de enfermedad humana. La IL-17A ejerce sus efectos a través de la interacción con su receptor afín, el receptor de la IL-17 (IL-17RA), y para la IL-17F, el IL-17RA. Por 45 tanto, la presente invención ha determinado que una anticuerpo de reactividad cruzada puede ser útil como antagonista tanto de IL-17A como de IL-17F, y, por consiguiente, para bloquear tanto la IL-17A como la IL-17F. De acuerdo con lo anterior, la presente invención aborda esta necesidad proporcionando moléculas terapéuticas (p. ej., anticuerpos), que pueden bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la actividad de tanto la IL-17A (la secuencia de polinucleótidos se muestra como la SEC ID N° 1 y el polipéptido codificado se muestra en la SEC ID N° 2) como la IL-17F (la secuencia de polinucleótidos se muestra en la SEC ID N° 3 y el polipéptido codificado se 50 muestra en la SEC ID N° 4). Por tanto, la presente invención está dirigida a anticuerpos de reactividad cruzada frente a IL-17A and IL-17F descritos en las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona además usos de los mismos en enfermedades inflamatorias, así como composiciones y procedimientos relacionados.

A) Visión general

5 Las enfermedades inflamatorias y relacionadas con el sistema inmunitario son la manifestación o la consecuencia de vías biológicas bastante complejas, a menudo con numerosas interconexiones, que en la fisiología normal son decisivas para responder a una agresión o lesión, iniciar la reparación de la agresión o lesión y organizar una defensa innata y adquirida contra organismos extraños. La enfermedad o la patología se produce cuando estas vías fisiológicas normales ocasionan una agresión o lesión adicional, bien relacionada directamente con la intensidad de la respuesta, o como consecuencia de la regulación anormal o la estimulación excesiva, o como una reacción contra lo propio, o como una combinación de ellas.

10 Aunque el origen de estas enfermedades implica a menudo vías de numerosas etapas y a menudo numerosas vías o sistemas biológicos diferentes, la intervención en puntos decisivos en una o más de estas vías puede tener un efecto terapéutico o de mejora. La intervención terapéutica se puede producir mediante el antagonismo de un proceso o vía perjudicial, o mediante la estimulación de un proceso o vía beneficioso.

15 Se conocen muchas enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico y se han estudiado extensamente. Estas enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunológico (tal como artritis reumatoide, enfermedad renal mediadas por el sistema inmunológico, las enfermedades hepato biliares, las enteropatías inflamatorias (EII), el síndrome del intestino irritable (SIR), la psoriasis y el asma), las enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmunológico, las enfermedades infecciosas, las inmunodeficiencias, las neoplasias, etc.

20 Los linfocitos T (células T) son un componente importante de una respuesta inmunitaria en los mamíferos. Los linfocitos T reconocen los antígenos que se asocian a una molécula propia codificada por genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). El antígeno se puede mostrar junto a las moléculas del CMH en la superficie de las células presentadoras de antígenos, células infectadas por virus, células cancerosas, injertos, etc. El sistema de linfocitos T elimina estas células alteradas que suponen una amenaza para la salud de un mamífero que las hospede. Los linfocitos T incluyen linfocitos T colaboradores y linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T colaboradores proliferan extensamente después del reconocimiento de un complejo antígeno-CMH sobre una célula presentadora de antígenos. Los linfocitos T colaboradores también secretan una serie de citocinas, es decir linfocinas, que desempeñan una función central en la activación de los linfocitos B, de los linfocitos T citotóxicos y de otras muchas células que participan en la respuesta inmunitaria.

30 Un acontecimiento central en la respuesta inmunitaria celular y la respuesta inmunitaria humoral es la activación y la expansión clonal de los linfocitos T colaboradores. La activación de los linfocitos T colaboradores se inicia mediante la interacción del complejo receptor de los linfocitos T (TCR)-CD3 con un antígeno-CMH sobre la superficie de una célula presentadora de antígenos. Esta interacción desencadena una cascada de acontecimientos bioquímicos que inducen la entrada de los linfocitos T colaboradores en reposo en el ciclo celular (transición de G0 a G1) y da lugar a la expresión de un receptor de alta afinidad por la IL-2 y a veces por la IL-4. Los linfocitos T activados progresan a través del ciclo celular y proliferan y se diferencian en linfocitos de memoria o linfocitos efectores.

35 Además de las señales mediadas por el TCR, la activación de los linfocitos T implica una coestimulación adicional inducida por las citocinas liberadas por las células presentadoras de antígeno o a través de interacciones con las moléculas unidas a la membrana sobre la célula presentadora de antígeno y sobre los linfocitos T. Se ha demostrado que las citocinas IL-1 e IL-6 proporcionan una señal coestimuladora. Asimismo, la interacción entre la molécula B7 expresada sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno y las moléculas CD28 y CTLA-4 expresadas sobre la superficie de los linfocitos T también efectúan la activación de los linfocitos T. Los linfocitos T activados expresan un mayor número de moléculas de adhesión celular, tal como ICAM-1, integrinas, VLA-4, LFA-1, CD56, etc.

40 La proliferación de los linfocitos T en un cultivo mixto de linfocitos o una reacción linfocítica mixta (RLM) es una indicación establecida de la capacidad de un compuesto para estimular el sistema inmunológico. En muchas respuestas inmunitarias, las células inflamatorias se infiltran en el sitio de la lesión o de la infección. Las células migratorias pueden ser neutrófilos, eosinófilos, monocitos o linfocitos, como se puede determinar mediante el estudio histológico de los tejidos afectados. Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

45 Las enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico se podrían tratar suprimiendo la respuesta inmunitaria. La utilización de receptores solubles y/o anticuerpos neutralizantes que inhiben las moléculas que tienen una actividad estimuladora del sistema inmunológico sería beneficiosa para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y con mediación del sistema inmunológico. Se pueden utilizar moléculas que inhiben la respuesta inmunitaria (directamente las proteínas o mediante el uso de agonistas de anticuerpos) para inhibir la respuesta inmunitaria y, por lo tanto, mejorar la enfermedad relacionada con la inmunidad.

50 Se ha identificado que la interleucina 17 (IL-17A) es un ortólogo celular de una proteína codificada por el virus del herpes linfotrópico T Saimiri (VHS) [véase, Rouvier y col., J. Immunol., 150(12): 5445 - 5456 (1993); Yao y col., J. Immunol., 122(12):5483 - 5486 (1995) y Yao y col., Immunity, 3(6):811 - 821 (1995)]. La caracterización posterior ha

demostrado que esta proteína es una citocina potente que actúa induciendo respuestas proinflamatorias en una amplia variedad de tejidos periféricos. La IL-17A es una citocina homodimérica unida por puentes disulfuro de aproximadamente 32 kDa sintetizada y secretada únicamente por los linfocitos T CD4+ de memoria activados (revisado en Fossiez y col., *Int. Rev. Immunol.*, 16: 541 - 551 [1998]). Específicamente, la IL-17 se sintetiza como un polipéptido precursor de 155 aminoácidos con una secuencia señal en el extremo N de 19 a 23 residuos y se secreta como una glucoproteína homodimérica unida por puentes disulfuro. La IL-17A se divulga en los documentos WO9518826 (1995), WO9715320 (1997) and WO9704097 (1997), así como en la patente de EE.UU. n.º 6 063 372.

A pesar de la escasa distribución en los tejidos, la IL-17A muestra actividades biológicas pleótopas en varios tipos de células. Se ha encontrado que la IL-17A estimula la producción de muchas citocinas. Induce la secreción de la IL-6, IL-8, IL-12, el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la prostaglandina E2, MCP-1 y el G-CSF por células adherentes como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales y células endoteliales. La IL-17A también tiene la capacidad de inducir la expresión en la superficie de ICAM-1, la proliferación de los linfocitos T y el crecimiento y la diferenciación en neutrófilos de las células progenitoras humanas CD34+. La IL-17A también ha estado implicada en el metabolismo óseo y se ha sugerido que desempeña una función importante en las situaciones patológicas caracterizadas por la presencia de linfocitos T activados y la producción del TNF alfa, tal como la artritis reumatoide y el aflojamiento de los implantes óseos (Van Bezooijen y col., *J. Bone Miner. Res.* 14: 1513 - 1521 [1999]). Se encontró que los linfocitos T activados del tejido sinovial obtenidos de pacientes con artritis reumatoide secretan cantidades mayores de IL17A que los obtenidos de individuos normales o pacientes con artrosis (Chabaud y col., *Arthritis Rheum.* 42: 963 - 970 [1999]). Se sugirió que esta citocina proinflamatoria contribuía activamente a la inflamación sinovial en la artritis reumatoide. Además de esta función proinflamatoria, la IL-17A parece contribuir a la anatomopatología de la artritis reumatoide, aunque por otro mecanismo. Por ejemplo, se ha demostrado que la IL-17A induce la expresión del ARNm del factor de diferenciación de osteoclastos (ODF) en los osteoblastos (Kotake y col., *J. Clin. Invest.*, 103: 1345 - 1352 [1999]). El ODF estimula la diferenciación de las células progenitoras en osteoclastos, que son las células implicadas en la resorción ósea.

Dado que la concentración de IL-17A aumenta significativamente en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide, parece que la formación de osteoclastos inducida por la IL-17A desempeña una función decisiva en la resorción ósea de la artritis reumatoide. También se cree que la IL-17A desempeña una función clave en determinados trastornos autoinmunitarios tal como la esclerosis múltiple (Matusevicius y col., *Mult. Scler.*, 5: 101 - 104 [1999]). Además, se ha demostrado que la IL-17A, mediante señalización intracelular, estimula la entrada de Ca^{2+} y la reducción de la concentración de AMPc en los macrófagos humanos (Jovanovic y col., *J. Immunol.*, 160:3513 [1998]). Los fibroblastos tratados con la IL-17A inducen la activación del NF kappa.B, [Yao y col., *Immunity*, 3:811 (1995), Jovanovic y col., ant.], aunque los macrófagos tratados con ella activan el NF-kappa.B y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (Shalom-Barek y col., *J. Biol. Chem.*, 273: 27467 [1998]).

Adicionalmente, la IL-17A también comparte similitud de secuencia con el factor 7 de tipo citocina de los mamíferos que está implicado en el crecimiento de los huesos y del cartílago. Otras proteínas con las que los polipéptidos de la IL-17A comparten similitud de secuencia son el factor relacionado con la interleucina obtenido de embriones humanos (EDIRF) y la interleucina 20.

De modo coherente con el amplio margen de efectos de la IL-17A, se ha encontrado que el receptor de la superficie celular de la IL-17A se expresa ampliamente en muchos tejidos y tipos de células (Yao y col., *Cytokine*, 9:794 [1997]). Mientras que la secuencia de aminoácidos del receptor de la IL-17A de humanos (IL17RA) (866 aminoácidos) predice una proteína con un único dominio transmembranal y un largo dominio intracelular de 525 aminoácidos, la secuencia del receptor es única y no se parece a la ninguno de los receptores de la familia de los receptores de citocinas/factores de crecimiento. Esto, unido a la falta de similitud de la propia IL-17A con otras proteínas conocidas, indica que la IL-17A y su receptor pueden ser parte de una nueva familia de proteínas y de receptores de señalización. Se ha demostrado que la actividad de la IL-17A está mediada por la unión a su único receptor de superficie celular, sobre lo que los estudios anteriores han demostrado que poner en contacto los linfocitos T con una forma soluble del polipéptido del receptor de la IL-17A inhibía la proliferación de los linfocitos T y la producción de IL-2 inducida por PHA, concanavalina A y el anticuerpo monoclonal anti-TCR (Yao y col., *J. Immunol.*, 155: 5483-5486 [1995]). Por tanto, hay un gran interés por identificar y caracterizar nuevos polipéptidos que tengan homología con los receptores de citocinas conocidos, específicamente los receptores de la IL-17A.

El patrón de expresión de la IL-17F parece ser similar al de la IL-17A, de tal modo que incluye sólo linfocitos T CD4+ activados y monocitos (Starnes y col., *J. Immunol.* 167: 4137 - 4140 [2001]). Se ha demostrado que la IL-17F induce G-CSF, IL-6 e IL-8 en los fibroblastos (Hymowitz y col., *EMBO J.* 20:5322 - 5341 [2001]) y TGF-b en células endoteliales (Starnes y col., *J. Immunol.* 167: 4137 - 4140 [2001]). Recientemente, se ha descrito que la IL-23, una citocina producida por las células dendríticas, puede intervenir en la producción de IL-17A y de IL-17F, principalmente en los linfocitos T de memoria (Aggarwal y col., *J. Biol. Chem.* 278: 1910-1914 [2003]).

Además, se ha demostrado sobreexpresión o regulación por aumento de la IL-17A y la IL-17F en los individuos con artritis y asma (revisado por Moseley y col., *Cytokine Growth Factor Rev* 14:155 - 174 [2003]). Con respecto a la artritis, estas citocinas actúan de un modo característico sobre el cartílago y la destrucción articular que se asocia a la artritis reumatoide y la artrosis. Por ejemplo, se ha demostrado que la IL-17A y la IL17F activan la degradación de la matriz en los explantes del cartílago articular mediante la liberación de glucosaminoglucanos, proteoglucano del

cartílago, y fragmentos de colágeno, al mismo tiempo que inhiben la síntesis de nuevos proteoglicanos y colágenos (Cai y col., *Cytokine* 16:10 - 21 [2001]; Attur y col., *Arthritis Rheum* 44:2078 - 2083 [2001]).

También se ha demostrado que, de modo similar a la IL-17A, la sobreexpresión de la IL-17F en ratones aumenta el reclutamiento de neutrófilos en el pulmón y da lugar a que aumente la expresión de las citocinas asociadas a Th1 en el pulmón, incluidas IL-6, IFN-gamma, IP-10 y MIG (Starnes y col., *J. Immunol.* 167: 4137 - 4140 [2001]). Asimismo, la IL-17F estaba regulada por aumento en los linfocitos T de asmáticos expuestos a alérgenos (Kawaguchi y col., *J. Immunol.* 167:4430-4435 [2001]), y se encontró que inducía la producción de IL-6 y de IL-8 en células NHBE. A diferencia de la IL-17A, la IL-17F parece inhibir la angiogénesis *in vitro* (Starnes y col., *J. Immunol.* 167: 4137 - 4140 [2001]).

No se detectó ARNm de la IL-17F mediante transferencia Northern en diferentes tejidos humanos, pero se indujo espectacularmente al activarse los linfocitos T CD4+ y los monocitos. Id. En ratones, se halló que los linfocitos Th2 y los mastocitos expresan IL-17F cuando se activan. Véase Dumont, *Expert Opin. Ther. Patents* 13(3) (2003). Al igual que la IL-17A, también se encontró que la IL-23 inducía la expresión de la IL-17F en ratones.

Las familias de citocina IL-17/receptor parecen representar un sistema de señalización único dentro de la red de citocinas que ofrecerá estrategias innovadoras para la manipulación de respuestas inmunitarias e inflamatorias. De acuerdo con esto, la presente invención está dirigida a anticuerpos que se unen a la IL-17A y a la IL-17F.

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen tanto a la IL-17A como a la IL-17F (anticuerpos IL-17A/F) y procedimientos para usar los anticuerpos IL-17A/F como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los anticuerpos pueden actuar como antagonistas o agonistas y encuentran utilidad para, entre otras cosas, diagnósticos *in vitro*, *in situ* o *in vivo* o tratamiento de células de mamíferos o de afecciones patológicas asociadas con la presencia (o ausencia) de IL-17A y/o IL-17F.

La invención se refiere a anticuerpos y a cualquier fragmento o permutación de los mismos que se unen tanto a IL-17A como a IL-17F (en el presente documento denominados de forma intercambiable "anticuerpos de reactividad cruzada", "anticuerpos A/F", "anticuerpos biespecíficos", "anticuerpos IL-17A/F" etc.). Específicamente, dichos anticuerpos son capaces de unirse específicamente a la IL-17A y la IL-17F humanas y/o son capaces de modular las actividades biológicas asociadas con una o las dos IL-17A e IL-17F y/o sus receptores, IL-17RA y IL-17RC, y, por tanto, son útiles en el tratamiento de varias enfermedades y afecciones patológicas tales como enfermedades relacionadas inmunitarias. En realizaciones más concretas, se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a la IL-17A (SEC ID N° 2) y la IL-17F (SEC ID N° 4). El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

De acuerdo con esto, la presente invención está dirigida a anticuerpos que se unen a la IL-17A y a la IL-17F. Los anticuerpos biespecíficos (BsAb) son anticuerpos que tienen dos sitios de unión a antígeno diferentes, de forma que el anticuerpo se une específicamente a dos antígenos diferentes. También se pueden preparar anticuerpos que tienen valencias más altas (es decir, la capacidad para unirse a más de dos antígenos); se les conoce como anticuerpos multiespecíficos.

El anticuerpo biespecífico es un anticuerpo monoclonal (MAb). En realizaciones concretas, el anticuerpo es quimérico o humanizado o totalmente humano. Los anticuerpos completamente humanos pueden generarse mediante procedimientos que implican la inmunización de ratones transgénicos, en los que los genes de inmunoglobulina humanos se han introducido en los ratones, como trata más adelante. Los anticuerpos biespecíficos de la invención, que se unen a IL-17A y a IL-17F, se denominan en el presente documento anticuerpos biespecíficos frente a IL-17A / F o MAb biespecíficos A/F.

En otras realizaciones concretas más, se proporciona la línea celular de hibridoma que produce anticuerpos monoclonales de la presente invención. En otra forma de realización, los anticuerpos frente a IL-17A / F están ligados a uno o más polímeros no proteináceos seleccionados del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol y polioxialquileno, o a un agente citotóxico o enzima, o a un radioisótopo, compuesto fluorescente o compuesto quimioluminiscente.

Los procedimientos típicos de la invención incluyen procedimientos para el tratamiento de afecciones patológicas o enfermedades en mamíferos asociadas con, o resultantes de, una expresión y / o actividad aumentada o potenciada de IL-17A o IL-17F. En los procedimientos de tratamiento, se pueden administrar anticuerpos de IL-17A / F que, preferentemente, bloquean o reducen la respectiva unión al receptor o activación de su o sus receptores. Opcionalmente, los anticuerpos de IL-17A / F empleados en los procedimientos serán capaces de bloquear o neutralizar la actividad de IL-17A e IL-17F, por ejemplo, un antagonista dual que bloquea o neutraliza la actividad tanto de IL-17A como de IL-17F (es decir, un anticuerpo de reactividad cruzada frente a IL-17A / F como se describe en el presente documento). Los procedimientos contemplan el uso de un solo anticuerpo de reactividad cruzada o una combinación de dos o más anticuerpos.

La invención también proporciona composiciones que comprenden anticuerpos de IL-17A / F. Opcionalmente, las composiciones de la invención incluirán vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, las composiciones incluirán uno o más anticuerpos IL-17A / F en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para tratar una afección patológica o enfermedad.

Como tal, la presente invención se refiere a composiciones y procedimientos útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario en mamíferos, incluidos los seres humanos. La presente invención se basa en la identificación de anticuerpos que se unen a IL-17A e IL-17F (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) que o estimulan o inhiben la respuesta inmunitaria en mamíferos. Las enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico se pueden tratar suprimiendo o potenciando la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos que potencian la respuesta inmunitaria estimulan o potencian la respuesta inmunitaria a un antígeno. Los anticuerpos que estimulan la respuesta inmunitaria se pueden utilizar terapéuticamente cuando el aumento de la respuesta inmunitaria sería beneficioso. Como alternativa, los anticuerpos que suprimen la respuesta inmunitaria atenúan o reducen la respuesta inmunitaria a un antígeno (*p. ej.*, anticuerpos neutralizantes) pueden utilizarse terapéuticamente cuando la atenuación de la respuesta inmunitaria sería beneficiosa (*p. ej.*, inflamación).

De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos que se unen tanto a IL-17A como a IL-17F (también denominados en el presente documento anticuerpos frente a IL-17A e IL-17F, IL-17A / F, n y / o de reactividad cruzada) de la presente invención y también son útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico e inflamatorias, incluyendo, por ejemplo, la artritis, la artritis psoriásica, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, enfermedad intestinal inflamatoria, la colitis, la enfermedad de Crohn y la psoriasis.

En un aspecto específico, dichas medicinas y medicamentos comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo frente a IL-17A/F con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la mezcla es estéril.

En otra realización, la invención se refiere a una composición de materia que comprende el anticuerpo de IL-17A / F mezclado con un vehículo o excipiente. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo frente a IL-17A/F. En otro aspecto, cuando la composición comprende un anticuerpo agonista de IL-17A / F de este tipo, la composición es útil para: (a) potenciar la infiltración de células inflamatorias en un tejido de un mamífero en necesidad del mismo, (b) estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en un mamífero que lo necesite, (c) aumentar la proliferación de linfocitos T en un mamífero que lo necesite en respuesta a un antígeno, (d) estimular la actividad de los linfocitos T o (e) aumentar la vascularización y la permeabilidad. En otro aspecto, cuando la composición comprende un anticuerpo antagonista de IL-17A / F de este tipo, la composición es útil para: (a) disminuir la infiltración de células inflamatorias en un tejido de un mamífero en necesidad del mismo, (b) inhibir o reducir una respuesta inmunitaria en un mamífero que lo necesite, (c) disminuir la actividad de linfocitos T o (d) disminuir la proliferación de los linfocitos T en un mamífero que lo necesite en respuesta a un antígeno. En otro aspecto, la composición comprende un ingrediente activo adicional, que puede, por ejemplo, ser un anticuerpo adicional o un agente citotóxico o quimioterapéutico. Preferentemente, la composición es estéril.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de un trastorno inmunológico relacionado en un mamífero que lo necesite, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo agonista o antagonista de IL-17A / F.

El trastorno inmunológico relacionado se selecciona del grupo que consiste en artritis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis, enfermedad de Crohn y psoriasis.

Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo o anticuerpo monocatenario. El anticuerpo puede marcarse y puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. En un aspecto adicional, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo antiidiotípico.

Los procedimientos para producir el mismo también se describen en el presente documento, en el que dichos procedimientos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión de dicho anticuerpo y recuperar dicho anticuerpo del cultivo celular.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo de IL-17A / F mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. Preferentemente, la composición es estéril. La composición se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica líquida, que puede conservarse para conseguir una estabilidad en almacenamiento prolongado. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo monocatenario.

La invención proporciona un anticuerpo aislado producido por el hibridoma con la designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7988 en el que el anticuerpo reduce la actividad proinflamatoria del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 2 o un fragmento del mismo y el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 4 o un fragmento del mismo.

La invención proporciona un hibridoma de (designación en el depósito de patente de la ATCC PTA-7988 y el anticuerpo producido por el hibridoma.

B) Definiciones

En la descripción siguiente se usan ampliamente una serie de términos. Las definiciones siguientes se proporcionan para facilitar la comprensión de la invención.

Los anticuerpos "(Abs) y las "inmunoglobulinas" (Igs) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos de la última clase se producen, por ejemplo, a niveles bajos en el sistema linfático y a niveles aumentados en los mielomas. Por tanto, como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" o la expresión "péptido(s) de anticuerpo(s)" se refiere a un anticuerpo intacto o a un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto para la unión específica e incluye anticuerpos biespecíficos quiméricos, humanizados y completamente humanos. En ciertas realizaciones, los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante. En realizaciones adicionales, los fragmentos de unión se producen mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos monocatenarios. Los "anticuerpos e inmunoglobulinas nativos" normalmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera también tienen puentes disulfuro intracatenarios separados de forma regular. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (VH) seguido por una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (VL) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que algunos residuos de aminoácidos concretos forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada (Clothia y col., J. Mol. Biol. 186:651 (1985); Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:4592 (1985)).

La expresión "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, hace referencia a un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo determinado mediante el método de Lowry y, lo más preferentemente, más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos internos o en el extremo N de la secuencia de aminoácidos mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. No obstante, habitualmente el anticuerpo aislado se preparará en al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo anti-IL-17A y / o IL-17F y / o IL-17A / F "variante", se refiere en el presente documento a una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos del anticuerpo "parental" frente a IL-17A / F y/o anti-IL-17 y/o IL-17A/F en virtud de la adición, delección y / o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo parental. En la realización preferida, la variante comprende una o más sustitución(es) de aminoácido(s) en una o más región(es) hipervariable(s) del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos uno, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez, y, preferentemente, de aproximadamente dos a aproximadamente cinco sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo parental. Habitualmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 75% con las secuencias del dominio variable de las cadenas pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferentemente al menos 80%, más preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90 %, y lo más preferentemente al menos 95%. Identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de anticuerpo parental, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia. No se debe interpretar que extensiones, delecciones o inserciones en el extremo N, el extremo C o internas en la secuencia de anticuerpos afectan a la identidad o la homología de secuencia. La variante retiene la capacidad de unirse a la IL-17A y / o la IL-17F humanas y, preferentemente, tiene propiedades que son superiores a las del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, una capacidad mejorada para inhibir la inflamación inducida por IL-17A y / o IL-17F. Para analizar dichas propiedades, se debe comparar una forma Fab de la variante a una forma Fab del anticuerpo parental o una forma de longitud completa de la variante a una forma de longitud completa del anticuerpo parental, por ejemplo, ya que se ha encontrado que el formato del anticuerpo anti-IL-17A y / o IL-17F y / o IL-17A / F afecta a su actividad en los ensayos de actividad biológica descritos en el presente documento. El anticuerpo variante de particular interés en el presente documento es uno que muestra al menos aproximadamente 10 veces, preferentemente al menos aproximadamente 20 veces, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces, la mejora de la actividad biológica cuando se compara con el anticuerpo parental.

El término "anticuerpo parental" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está codificado por una secuencia de aminoácidos utilizada para la preparación de la variante. Preferentemente, el

anticuerpo parental tiene una región marco humana y, si está presente, tiene región(es) constante(s) del anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

5 El término "agonista" se refiere a cualquier compuesto, incluidos una proteína, polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula grande o molécula pequeña (menor de 10 kDa), que incrementa la actividad, activación o función de otra molécula.

El término "antagonista" se refiere a cualquier compuesto, incluidos una proteína, polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula grande o molécula pequeña (menor de 10 kDa), que disminuye la actividad, activación o función de otra molécula.

10 El término "unión de un polipéptido de la invención a un ligando" incluye, entre otros, la unión de un polipéptido ligando de la presente invención a un receptor; la unión de un polipéptido receptor de la presente invención a un ligando; la unión de un anticuerpo de la presente invención a un antígeno o epítipo; la unión de un antígeno o epítipo de la presente invención a un anticuerpo; la unión de un anticuerpo de la presente invención a un anticuerpo antiidiotípico; la unión de un anticuerpo antiidiotípico de la presente invención a un ligando; la unión de un anticuerpo antiidiotípico de la presente invención a un receptor; la unión de un anticuerpo antiidiotípico de la presente invención a un ligando, receptor o anticuerpo, etc.

15 Se entiende que un "anticuerpo bivalente" aparte de un anticuerpo "multiespecífico" o "multifuncional", en ciertas realizaciones, comprende sitios de unión que tienen idéntica especificidad antigénica.

20 Un anticuerpo "bienespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos bienespecíficos se pueden producir mediante diversos procedimientos, incluidos, entre otros, fusión de hibridomas o unión de los fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann (1990), Clin. Exp. Immunol. 79:315 - 321; Kostelny y col., (1992), J. Immunol. 148:1547 - 1553.

25 La expresión "anticuerpo quimérico" o "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos cuyos genes de las cadenas pesadas y ligeras se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de genes de las regiones variables y constantes de inmunoglobulina que pertenecen a especies diferentes. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos, tales como gamma 1 y gamma 3. Un anticuerpo quimérico terapéutico típico es, por tanto, una proteína híbrida compuesta por el dominio variable o de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante de un anticuerpo humano, aunque pueden utilizarse otras especies de mamíferos. Específicamente, un anticuerpo quimérico se produce por tecnología de ADN recombinante en la que la totalidad o parte de las regiones bisagra y constante de una cadena ligera de inmunoglobulina, cadena pesada, o ambas, se han sustituido por las regiones correspondientes de la cadena ligera o la cadena pesada de la inmunoglobulina de otro animal. De esta manera, la porción de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal parental se injerta en la estructura básica vertebral del anticuerpo de otra especie. Un enfoque, descrito en el documento EP 0239400 de Winter y col., describe la sustitución de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie por las de otra especie, tales como la sustitución de las CDR de los dominios de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina por las CDR de los dominios de la región variable de ratón. Estos anticuerpos alterados pueden combinarse posteriormente con regiones constantes de inmunoglobulina humana para formar anticuerpos que son humanos, excepto por las CDR murinas sustituidas que son específicas del antígeno. Los procedimientos para el injerto de las regiones CDR de anticuerpos se pueden encontrar en, por ejemplo, Riechmann y col., (1988) Nature 332:323 - 327 y Verhoeven y col., (1988) Science 239:1534 - 1536.

45 La expresión "título de neutralización eficaz" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a la cantidad de anticuerpo que corresponde a la cantidad presente en el suero de los animales (rata humana o de algodón) que se ha demostrado que es clínicamente eficaz (en seres humanos) o para reducir el virus en un 99% en, por ejemplo, ratas de algodón. La reducción del 99% se define mediante la exposición específica de, por ejemplo, 10^3 upf, 10^4 upf, 10^5 upf, 10^6 upf, 10^7 upf, 10^8 upf, o 10^9 upf) del VSR.

50 Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a la porción de un antígeno al que se une específicamente un anticuerpo monoclonal. Por tanto, el término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse de forma específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. Los determinantes epitópicos normalmente constan de grupos de superficie químicamente de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Más específicamente, el término "epítipo de IL-17A", "epítipo de IL-17F" y/o "epítipo de IL-17A/F" como se usa en el presente documento, se refiere a una porción de un polipéptido correspondiente que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente en un mamífero, y, más preferentemente, en un ratón o un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido de IL-17A y/o IL-17F que produce una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una porción de un polipéptido de IL-17A y/o IL-17F al que un anticuerpo se une inmunoespecíficamente, según se determina mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo mediante inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no necesariamente tienen que ser inmunogénicos. Dichos epítipos pueden ser de naturaleza

lineal o pueden ser un epítipo discontinuo. Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "epítipo conformacional" se refiere a un epítipo discontinuo formado por una relación espacial entre los aminoácidos de un antígeno distinto de una serie interrumpida de aminoácidos. Más específicamente, el término epítipo abarca los epítipos según se define en el presente documento, ya que se aplican tanto a IL-17A como a IL-17F.

El término "epítipo marcado" cuando se usa en el presente documento se refiere al anticuerpo anti-IL-17A y / o anti-IL-17F y / o anti-IL-17A / F fusionado a un "marcador de epítipo". El polipéptido marcador de epítipo tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es lo bastante corto como para no interferir en la actividad de los anticuerpos de la presente invención. La marca de epítipo preferentemente es lo suficientemente única como para que el anticuerpo contra el mismo no reaccione de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos 6 residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8-50 residuos de aminoácidos (preferentemente entre aproximadamente 9-30 residuos). Los ejemplos incluyen el polipéptido marcador de la HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field y col., Mol.Celular.Biol.8:2159-2165 (1988)); el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 frente al mismo (Evan y col., Mol.Celular.Biol.5 (12) :3610-3616 (1985)); y el marcador de la glicoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky y col., Protein Engineering 3 (6): 547-553 (1990)). En ciertas realizaciones, el marcador de epítipo es un "epítipo de unión a receptor de rescate". Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable del aumento de la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

El término "fragmento", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200 residuos de aminoácidos contiguos o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de I1 - 17A o IL-17F o un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido de IL - 17A o de IL-17F o de IL-17A e IL-17F.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, en la que cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son, juntas, responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 kDa o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable en el extremo NH₂ (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulinas de longitud completa (aproximadamente 50 kDa o 446 aminoácidos) están codificadas, de forma similar, por el gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionados en lo que antecede (aproximadamente 330 aminoácidos). Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. (Véase, generalmente, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7.

Una región variable de las cadenas ligera o pesada de inmunoglobulina consiste en una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables. Por tanto, la expresión "región hipervariable" se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de una "Región Determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (L1), 5052 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917). 901 - 917). "Región Marco" o residuos "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se define en el presente documento. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie. Por tanto, una "región marco humana" es una región marco que es sustancialmente idéntica (aproximadamente el 85% o más, por lo general 90-95% o más) a la región marco de una inmunoglobulina humana de origen natural. La región estructural de un anticuerpo, es decir las regiones marco combinadas de las cadenas ligera y pesada constituyentes, sirve para

posicionar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno.

De acuerdo con lo anterior, el término inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por lo general un ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptor". Las regiones constantes no tienen que estar presentes, pero si lo están, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85-90%, preferentemente de aproximadamente 95% o más idénticas. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CRD, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una cadena ligera humanizada y una cadena pesada humanizada de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado no abarcaría un anticuerpo quimérico típico como se ha definido anteriormente, por ejemplo, debido a que toda la región variable de un anticuerpo quimérico es no humana.

Como se usa en el documento, la expresión "anticuerpos humanos" incluye los anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluye anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como describen, por ejemplo, Kucherlapati y col., en la patente de EE.UU. N° 5.939.598.

La expresión "anticuerpos genéticamente alterados" significa anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos se ha modificado con respecto a la de un anticuerpo nativo. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, no es necesario limitarlos a las secuencias de aminoácidos que se encuentran en los anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden rediseñarse para obtener las características deseadas. Las posibles variaciones son muchas y varían desde el cambio de solo uno o unos pocos aminoácidos a el rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. Los cambios en la región constante se realizarán, en general, con el fin de mejorar o alterar las características, tales como fijación del complemento, interacción con membranas y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se realizarán con el fin de mejorar las características de unión al antígeno.

Además de los anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en diversas otras formas, incluidos, por ejemplo monocatenarios, Fv, Fab y (Fab')₂, así como diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos híbridos multivalentes o multiespecíficos (como se ha descrito anteriormente y con detalle en: Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) y en cadenas sencillas (e.g., Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5879 - 5883 (1988) y Bird y col., Science, 242, 423 - 426 (1988)). (Véase, generalmente, Hood y col., "Immunology", Benjamin, N.Y., 2ª ed. (1984), y Hunkapiller and Hood, Nature, 323, 15 - 16 (1986)).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "Fv de cadena sencilla", "anticuerpos de cadena sencilla" "Fv" o "scFv" se refieren a fragmentos de anticuerpos que comprenden las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, pero que carecen de las regiones constantes, pero dentro de una una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, un anticuerpo monocatenario además comprende un ligador polipeptídico entre los dominios VH y VL que le permite formar la estructura deseada que permitiría la unión al antígeno. Los anticuerpos monocatenarios se tratan con detalle en Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994). Se conocen varios procedimientos de generación de anticuerpos monocatenarios, incluyendo los descritos en las patentes de EE.UU. N° 4.694.778 y 5.260.203; la publicación de solicitud de patente internacional n° WO 88/01649; Bird (1988) Science 242:423 - 442; Huston y col., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879 - 5883; Ward y col., (1989) Nature 334:54454; Skerra y col., (1988) Science 242:1038 - 1041. En realizaciones específicas, los anticuerpos monocatenarios también pueden ser biespecíficos y / o humanizados.

Un "fragmento Fab" está compuesto por una cadena ligera y las regiones C_{H1} y variable de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un puente disulfuro con otra molécula de la cadena pesada.

Un "fragmento Fab'" contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios de C_{H1} y C_{H2}, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂.

Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante, entre los dominios de C_{H1} y C_{H2}, de modo que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, en los que los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Usando un ligador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más a fondo en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y Hollinger, y col., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 90:64446448, (1993).

La expresión de "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata y col., Protein Eng. 8(10):1057 - 1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1VH- CH1) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser

5

La expresión "fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento polipeptídico que contiene al menos los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención puede unirse a un ligando, de modo que se evita la unión del ligando a su receptor, interrumpiendo la respuesta biológica que es el resultado de la unión del ligando al receptor, o cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención se une específicamente tanto a IL-17A como a IL-17F.

10

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria, no está limitada a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluido un clon eucariota, procarriota o de fago, y no el procedimiento por el cual se produce.

15

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados mediante cualquier unión, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos naturales (tales como ADN y ARN) o análogos de los oligonucleótidos que se producen en la naturaleza (p. ej., formas α -enantioméricas de nucleótidos que se producen en la naturaleza) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de bases pirimidínicas o púricas. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, la sustitución de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, la totalidad del resto de azúcar se puede reemplazar con estructuras estérica y electrónicamente similares, tales como azúcares aza y análogos de azúcar carbocíclico. Ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos mediante enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Análogos de enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosfordiselenoato, fosforoanilotoato, fosforoanilidato, fosforoamidato y similares. La expresión "molécula de ácido nucleico" también incluye los denominados "ácidos nucleicos peptídicos", que comprenden bases de ácido nucleico que se producen en la naturaleza o modificados unidas a un armazón de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

20

25

30

35

La expresión "complemento de una molécula de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria de 5' CCCGTGCAT 3'.

La expresión "secuencia de nucleótidos degenerada" indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido. Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican ambos Asp).

40

La expresión "gen estructural" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se transcribe en un ARN mensajero (ARNm), que después se traduce a una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie concreta es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de dicha especie.

45

Una "construcción de molécula de ácido nucleico" es una molécula de ácido nucleico, monocatenaria o bicatenaria, que se ha modificado mediante intervención humana para contener segmentos de ácido nucleico combinados o yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.

50

"ADN lineal" indica moléculas de ADN no circulares que tienen extremos 5' y 3' libres. El ADN lineal se puede preparar a partir de moléculas de ADN circular cerrado, tal como plásmidos, mediante digestión enzimática o alteración física.

55

"ADN complementario (ADNc)" es una molécula de ADN monocatenario que se forma a partir de un molde de ARNm mediante la enzima transcriptasa inversa. Normalmente, para el inicio de la transcripción inversa se emplea un

cebador complementario a las porciones de ARNm. Los expertos en la técnica también usan el término “ADNc” para hacer referencia a una molécula de ADN bicatenario que consiste en dicha molécula de ADN monocatenario y su hebra de ADN complementario. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizada a partir de un molde de ARN.

5 Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Normalmente, un promotor se localiza en la región no codificadora 5' de un gen, proximal al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Elementos de secuencia dentro de los promotores que funcionan al inicio de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión para la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE; McGehee y col., Mol. Endocrinol. 7:551 (1993)), elementos de respuesta al AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta al suero (SRE; Treisman, Seminars in Cancer Biol 1:47 (1990)), elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE); y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O'Reilly y col., J. Biol. Chem. 267:19938 (1992)), AP2 (Ye y col., J. Biol. Chem. 269:25728 (1994)), SP1, proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB; Loeken, Gene Expr. 3:253 (1993)) y factores octámeros (véase, en general, Watson y col., eds., Molecular Biology of the Gene, 4^a ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre and Rousseau, Biochem. J. 303:1 (1994)). Si un promotor es un promotor inducible, la velocidad de la transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, la velocidad de la transcripción no está regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores represibles.

20 Un “promotor núcleo” contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función del promotor, incluida la caja TATA y el inicio de la transcripción. Mediante esta definición, un promotor núcleo puede o no tener actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica de tejido.

25 Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor central. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une con factores celulares, lo que permite la transcripción exclusiva o preferentemente en células, tejidos u orgánulos concretos. Estos tipos de elementos reguladores normalmente están asociados con genes que se expresan de un modo “específico de célula”, “específico de tejido” o “específico de orgánulo”.

Un “potenciador” es un tipo de elemento regulador que puede incrementar la eficiencia de la transcripción, con independencia de la distancia u orientación del potenciador con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

30 “ADN heterólogo” se refiere a una molécula de ADN o una población de moléculas de ADN que no existe de forma natural dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas de una célula huésped concreta puede contener ADN derivado de la especie de célula huésped (es decir, ADN endógeno) siempre que el ADN huésped se combine con un ADN no huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no huésped que codifica un polipéptido unido operablemente a un segmento de ADN huésped que comprende un promotor de la transcripción se considera una molécula de ADN heterólogo. Por el contrario, una molécula de ADN heterólogo puede comprender un gen endógeno unido operablemente a un promotor exógeno. Como otra ilustración, una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula silvestre se considera ADN heterólogo si dicha molécula de ADN se introduce en una célula mutante que carece del gen silvestre.

40 Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producidos de forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 residuos de aminoácidos normalmente se denominan “péptidos”.

45 Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína puede también comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. La célula en la que se produce la proteína puede añadir carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos y esto variará con el tipo de célula. En el presente documento, las proteínas se definen en términos de sus estructuras armazón de aminoácido; en general, no se especifican sustituyentes tales como grupos carbohidrato, pero en cualquier caso pueden estar presentes.

Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no huésped es un péptido o polipéptido “heterólogo”.

50 Un “vector de clonación” es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, un cósmido o un bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma en una célula huésped. Normalmente, los vectores de clonación contienen uno o un número pequeño de sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico de un modo determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para usar en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Normalmente, los genes marcadores incluyen genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o resistencia a ampicilina.

55 Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Normalmente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. Normalmente, la expresión génica está bajo el control de un promotor y se dice que dicho gen

está “unido operablemente al” promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor central están unidos operablemente si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

5 Un “huésped recombinante” es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heterólogo, tal como un vector de clonación o vector de expresión. En el presente contexto, un ejemplo de un huésped recombinante es una célula que produce IL-17RA a partir de un vector de expresión. En contraste con ello, una célula, que es una “fuente natural” de IL-17RA y que carece de un vector de expresión, puede producir IL-17RA .

“Transformantes de integración” son células huésped recombinantes en las que el ADN heterólogo se ha integrado en el ADN genómico de las células.

10 Una “proteína de fusión” es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos de al menos dos genes. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender al menos parte de un polipéptido de IL-17RA condensado con un polipéptido que se une a una matriz de afinidad. Dicha proteína de fusión proporciona un medio para aislar grandes cantidades de IL-17RA usando cromatografía de afinidad.

15 El término “receptor” indica una proteína asociada a la célula que se une a una molécula bioactiva denominada “ligando”. Esta interacción participa en el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares, monoméricos (p. ej., el receptor de la hormona estimulante del tiroides, receptor beta adrenérgico) o multiméricos (p. ej., un receptor de PDGF, receptor de la hormona de crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6). Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio extracelular de unión al ligando y un dominio efector intracelular que normalmente está implicado en la transducción de la señal. En ciertos receptores unidos a membrana, el dominio extracelular de unión al ligando y el dominio efector intracelular se localizan en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

25 En general, la unión del ligando al receptor tiene como resultado un cambio conformacional en el receptor que produce una interacción entre el dominio efector y otra(s) molécula(s) en la célula, lo que a su vez conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que a menudo están vinculados a interacciones receptor-ligando incluyen la transcripción génica, la fosforilación, la defosforilación, incrementos en la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de los lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos.

30 La expresión “secuencia señal secretora” indica una secuencia de ADN que codifica un péptido (un “péptido secretor”) que, como componente de un polipéptido más grande, dirige al polipéptido más grande a través de una vía secretora de una célula en la que se sintetiza. Normalmente, el polipéptido más grande se escinde para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la vía secretora.

35 Un “polipéptido aislado” es un polipéptido que esencialmente carece de componentes celulares contaminantes, tales como hidratos de carbono, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza. Normalmente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir una pureza de al menos aproximadamente 80%, de al menos aproximadamente 90%, de al menos aproximadamente 95%, de una pureza superior al 95%, tal como 96%, 97% o 98% o más puro, o superior al 99% de pureza. Un modo de mostrar que una preparación de proteínas concreta contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una única banda tras la electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida de la preparación de proteínas y la tinción del gel con azul de Coomassie brillante. No obstante, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o, como alternativa, formas glicosiladas o derivadas.

45 Los términos “amino terminal” y “carboxi terminal” se usan en el presente documento para indicar las posiciones dentro de los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o porción concreta de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia en posición carboxi terminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se localiza proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no necesariamente está en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

50 El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en el ARNm y la traducción del ARNm en uno o más polipéptidos.

Como se usa en el presente documento, el término “inmunomodulador” incluye citocinas, factores de crecimiento de células madre, linfoquinas, moléculas coestimuladoras, factores hematopoyéticos y similares, y análogos sintéticos de estas moléculas.

55 La expresión “par de complemento/anti-complemento” indica restos no idénticos que forman un par estable asociado de forma no covalente en las condiciones adecuadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son miembros prototipo de un par de complemento/anti-complemento. Otros pares complemento/anti-complemento de

ejemplo incluyen pares de receptor/ligando, anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido y similares. Cuando se desea la posterior disociación del par complemento/anti-complemento, el par complemento/anti-complemento tiene, preferentemente, una afinidad de unión inferior a 10^9 M^{-1} .

5 Como se usa en el presente documento, un "agente terapéutico" es una molécula o átomo que está conjugada a un resto anticuerpo para producir un conjugado que es útil para terapia. Ejemplos de agentes terapéuticos incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes o pigmentos fotoactivos y radioisótopos.

10 Un "indicador detectable" es una molécula o átomo que puede estar conjugada a un resto anticuerpo para producir una molécula útil para diagnóstico. Ejemplos de indicadores detectables incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos u otros restos marcadores.

15 La expresión "marcador de afinidad" se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que se puede fijar a un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporcionar sitios de unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, se puede usar cualquier péptido o proteína para la cual existe un anticuerpo u otro agente de unión específico como marcador de afinidad. Los marcadores de afinidad incluyen una cola de polihistidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4:1075 (1985); Nilsson y col., Methods Enzymol. 198:3 (1991)), glutatión S transferasa (Smith and Johnson, Gene 67:31 (1988)), marcador de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp y col., Biotechnology 6:1204 (1988)), péptido de unión a estreptavidina u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2:95 (1991). Las moléculas de ADN que codifica marcadores de afinidad están disponibles en proveedores comerciales (p. ej., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

25 Un "polipéptido diana" o un "péptido diana" es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un epítipo y que se expresa en una célula diana, tal como una célula tumoral o una célula portadora de un antígeno de un agente infeccioso. Los linfocitos T reconocen epítopos peptídicos presentados por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad a un polipéptido diana o péptido diana y normalmente lisan la célula diana o reclutan otras células inmunitarias para el lugar de la célula diana, de modo que matan la célula diana.

30 En eucariotas, la ARN polimerasa II cataliza la transcripción de un gen estructural para producir ARNm. Se puede diseñar una molécula de ácido nucleico para que contenga un molde para la ARN polimerasa II en el que el transcrito de ARN tiene una secuencia que es complementaria a la de un ARNm específico. El transcrito de ARN se denomina "ARN antisentido" y una molécula de ácido nucleico que codifica el ARN antisentido se denomina "gen antisentido". Las moléculas de ARN antisentido son capaces de unirse a las moléculas de ARNm, lo que tiene como resultado una inhibición de la traducción del ARNm.

35 Un "oligonucleótido antisentido específico de IL-17A or IL-17F" es un oligonucleótido que tiene una secuencia (a) capaz de formar un triplex estable con una porción del gen de IL-17A o IL-17F o (b) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de ARNm del gen de IL-17A o IL-17F.

Una "ribozima" es una molécula de ácido nucleico que contiene un centro catalítico. El término incluye enzimas de ARN, ARN de autocorte y empalme, ARN de autoescisión y moléculas de ácido nucleico que realizan estas funciones catalíticas. Una molécula de ácido nucleico que codifica una ribozima se denomina "gen de ribozima".

40 Una "secuencia guía externa" es una molécula de ácido nucleico que dirige la ribozima endógena, la ARNasa P, a una especie concreta de ARNm intracelular, que tiene como resultado la escisión del ARNm por la ARNasa P. Una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia guía externa se denomina un "gen de secuencia guía externa".

45 La expresión "variante alélica" se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica aparece de forma natural a través de mutación y puede tener como resultado un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silentes (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. La expresión variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

50 El término "ortólogo" indica un polipéptido o proteína obtenido de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

"Parálogos" son proteínas distintas pero estructuralmente relacionadas producidas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen por duplicación génica. Por ejemplo, α -globina, β -globina y mioglobina son parálogos unas de otras.

55 Debido a la imprecisión de los procedimientos analíticos estándar, se entiende que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros son valores aproximados. Cuando tal valor se expresa como "alrededor de" X o

“aproximadamente” X, se entenderá que el valor indicado de X es preciso a $\pm 10\%$.

C) Anticuerpos que se unen a IL-17A y IL-17F

5 Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a la IL-17A y a la IL-17F. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a la forma monomérica de IL-17A y de IL-17F. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se unen a una forma homodimérica de IL-17A o de IL-17F. En otras realizaciones más, los anticuerpos de la invención se unen específicamente a la forma multimérica de IL-17A y de IL-17F (p. ej., una forma heterodimérica). Los anticuerpos preferidos de la invención bloquean una actividad biológica de IL-17A y de IL-17F.

10 Los anticuerpos preferidos, y anticuerpos adecuados para uso en el procedimiento de la invención, incluyen, por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, homólogos de anticuerpos humanos, homólogos de anticuerpos humanizados, homólogos de anticuerpos quiméricos, fragmentos de anticuerpos Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), anticuerpos monocatenarios y monómeros o dímeros de cadenas ligeras o pesadas de anticuerpos o mezclas de los mismos. Los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales.

15 Los anticuerpos de la invención pueden incluir inmunoglobulinas intactas de cualquier isotipo, incluyendo los tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de los mismos). Los anticuerpos incluyen preferentemente IgG intacta y más preferentemente IgG1. Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser lambda o kappa. Las cadenas ligeras son, preferentemente, kappa.

20 Los anticuerpos de la invención incluyen porciones de anticuerpos intactos que conservan especificidad de unión al antígeno, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', F(ab')₂, fragmentos F(v), monómeros o dímeros de la cadena pesada, monómeros o dímeros de la cadena ligera, dímeros que consisten en una cadena pesada y una cadena ligera, y similares. Por lo tanto, los fragmentos de unión a antígeno, así como los polipéptidos dimericos o triméricos de longitud completa derivados de los anticuerpos descritos anteriormente son en sí mismos útiles.

25 El uso directo de los anticuerpos monoclonales de roedores (MAb) como agentes terapéuticos humanos condujo a respuestas de anticuerpos anti-roedores humanas ("HARA") (por ejemplo, anticuerpos humanos anti-ratón ("HAMA")) que se produjeron en un número significativo de pacientes tratados con el anticuerpo derivado de roedor (Khazaeli, y col., (1994) Immunother. 15:42 - 52). Se cree que los anticuerpos quiméricos que contienen un menor número de secuencias de aminoácidos murinos eluden el problema de provocar una respuesta inmunitaria en los seres humanos.

30 El refinamiento de los anticuerpos para evitar el problema de las respuestas HARA condujo al desarrollo de "anticuerpos humanizados". Los anticuerpos humanizados se producen mediante tecnología de ADN recombinante, en la que al menos uno de los aminoácidos de una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina humana que no se requiere para la unión al antígeno se ha sustituido por el aminoácido correspondiente a partir de la cadena ligera o pesada de inmunoglobulina de mamífero no humano. Por ejemplo, si la inmunoglobulina es un anticuerpo monoclonal de ratón, por lo menos un aminoácido que no se requiere para la unión al antígeno está sustituido con el aminoácido que está presente en un anticuerpo humano correspondiente en esa posición. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que la "humanización" del anticuerpo monoclonal inhibe la reactividad inmunológica humana contra la molécula de inmunoglobulina extraña.

35 Como un ejemplo no limitante, un procedimiento de realización de injerto de la región determinante de la complementariedad (CDR) puede llevarse a cabo mediante la secuenciación de las cadenas pesada y ligera de ratón del anticuerpo de interés que se une al antígeno diana (por ejemplo, IL-17A e IL-17F) y la ingeniería genética de las secuencias de ADN de las CDR y la imposición de estas secuencias de aminoácidos para las regiones V humana correspondiente mediante mutagénesis dirigida al sitio. Se añaden segmentos génicos de la región constante humana del isotipo deseado y los genes de las cadenas pesadas y ligeras "humanizadas" se co-expresan en células de mamífero para producir anticuerpo humanizado soluble. Una célula de expresión típica es una célula de ovario de hámster chino (CHO). Los procedimientos adecuados para crear los anticuerpos quiméricos se pueden encontrar en, por ejemplo, Jones y col., (1986) Nature 321:522 - 525; Riechmann (1988) Nature 332:323 - 327; Queen y col., (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:10029; y Orlandi y col., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833.

40 Queen y col., (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:10029 - 10033 y el documento WO 90/07861 describen la preparación de un anticuerpo humanizado. Las regiones marco variables humanas y de ratón se eligieron para la homología de la secuencia de la proteína óptima. La estructura terciaria de la región variable murina fue modelada por ordenador y superpuesta a la estructura humana homóloga para mostrar la interacción óptima de residuos de aminoácidos con las CDR de ratón. Esto llevó al desarrollo de anticuerpos con afinidad de unión por el antígeno mejorada (que normalmente se disminuye tras la fabricación de anticuerpos quiméricos injertados con CDR). En la técnica se conocen enfoques alternativos para fabricar anticuerpos humanizados y se describen en, por ejemplo, Tempest (1991) Biotechnology 9:266-271.

55 Los anticuerpos de la invención se pueden usar solos o como inmunoconjugados con un agente citotóxico. En algunas realizaciones, el agente es un agente quimioterapéutico. En algunas formas de realización, el agente es un

radioisótopo, incluyendo, entre otros, plomo-212, bismuto-212, astato-211, yodo-131, escandio-47, renio-186, renio-188, itrio-90, yodo-123, yodo-125, Bromo-77, Indio-111, y los nucleidos fisionables tales como boro-10 o un actínido. En otras formas de realización, el agente es una toxina o fármaco citotóxico, incluyendo, entre otros, enterotoxina A modificada de *Pseudomonas*, caliqueamicina, adriamicina, 5-fluorouracilo, y similares. Los procedimientos de conjugación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos a tales agentes son conocidos en la literatura.

Los anticuerpos de la invención incluyen derivados que se han modificado, por ejemplo mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no impide la unión del anticuerpo a su epítipo. Ejemplos de derivados adecuados incluyen, entre otros, anticuerpos y fragmentos fucosilados, anticuerpos y fragmentos glicosilados, anticuerpos y fragmentos acetilados, anticuerpos y fragmentos pegilados, anticuerpos y fragmentos fosforilados, y anticuerpos y fragmentos amidados. Los anticuerpos y derivados de los mismos de la invención pueden ellos mismos derivarse mediante grupos protectores / bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otras proteínas, y similares. En algunas formas de realización de la invención, se fucosilada al menos una cadena pesada del anticuerpo. En algunas realizaciones, la fucosilación está unida a N. En algunas realizaciones preferidas, al menos una cadena pesada del anticuerpo comprende un oligosacárido fucosilado unido a N.

Los anticuerpos de la invención incluyen variantes que tienen una o más sustituciones, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos, que retienen las propiedades biológicas (por ejemplo, bloquean la unión de la IL-17A y / o IL-17F a sus respectivos receptores, bloquean la biológica actividad de la IL-17A e IL-17F, afinidad de unión) de los anticuerpos de la invención. El experto en la técnica puede producir variantes que tienen una o varias sustituciones, deleciones, adiciones o reemplazos de aminoácidos. Estas variantes pueden incluir, entre otras: (a) variantes en las que uno o más residuos de aminoácidos están sustituidos por aminoácidos conservadores o no conservadores, (b) variantes en las que se añaden o delecionan del polipéptido uno o más aminoácidos, (c) variantes en las que uno o más aminoácidos incluyen un grupo sustituyente y (d) variantes en las que el polipéptido se condensa con otro péptido o polipéptido, tal como una pareja de fusión, un marcador proteico u otro resto químico, que puede conferir propiedades útiles al polipéptido, tal como, por ejemplo, un epítipo para un anticuerpo, una secuencia de polihistidina, un resto de biotina y similares. Los anticuerpos de la invención pueden incluir variantes en las que se sustituyen residuos de aminoácidos de una especie por el residuo correspondiente en otra especie, ya sea en las posiciones conservadas o no conservadas. En otra realización, los residuos de aminoácidos en las posiciones no conservadas están sustituidos con residuos de conservadores o no conservadores. Los expertos en la materia conocen las técnicas para obtener estas variantes, incluidas técnicas genéticas (supresiones, deleciones, mutaciones etc.), químicas y enzimáticas. Los anticuerpos de la invención también incluyen fragmentos de anticuerpos. Un "fragmento" se refiere a secuencias de polipéptidos que tienen, preferentemente, al menos aproximadamente 40, más preferentemente al menos a aproximadamente 50, más preferentemente al menos aproximadamente 60, más preferentemente al menos aproximadamente 70, más preferentemente al menos aproximadamente 80, más preferentemente al menos aproximadamente 90, y más preferentemente al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, y que conservan cierta actividad biológica o actividad inmunológica de la secuencia de longitud completa, por ejemplo, la capacidad de bloquear la unión de IL-17A y / o IL-17F a sus respectivos receptores, de bloquear la actividad biológica de la IL-17A e IL-17F, la afinidad de unión.

Los anticuerpos de la invención son, preferentemente, no tóxicos, como se demuestra, por ejemplo, en los estudios de toxicología *in vivo*.

Los anticuerpos y derivados de los mismos de la invención tienen afinidades de unión que incluyen una constante de disociación (K_d) de menos de 1×10^{-2} . En algunas realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-3} . En otras realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-4} . En algunas realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-5} . En otras realizaciones más, la K_d es de menos de 1×10^{-6} . En otras realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-7} . En otras realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-8} . En otras realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-9} . En otras realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-10} . En todavía otras realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-11} . En algunas realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-12} . En otras realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-13} . En otras realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-14} . En todavía otras realizaciones, la K_d es de menos de 1×10^{-15} .

D) Ácidos nucleicos

La invención también se refiere a ácidos nucleicos que condifican la cadena pesada y/o la cadena ligera de los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos de la invención incluyen ácidos nucleicos que tienen al menos 80%, más preferentemente al menos aproximadamente 90%, más preferentemente al menos aproximadamente 95%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 98% de homología con los ácidos nucleicos de la invención. Las expresiones "porcentaje de similitud", "porcentaje de identidad" y "porcentaje de homología" cuando hacen referencia a una secuencia concreta, se utilizan como se establece en el programa de software GCG de la Universidad de Wisconsin. Los ácidos nucleicos de la invención también incluyen ácidos nucleicos complementarios. En algunos casos, las secuencias serán totalmente complementarias (sin falta de coincidencias) cuando se alinean. En otros casos, puede haber una falta de apareamiento de aproximadamente un 20% en las secuencias. En algunas realizaciones de la invención se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo de la invención.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden clonarse en un vector, tal como un plásmido, cósmido, báculo, fago, cromosoma artificial (BAC, YAC) o virus, en el que otra secuencia genética o elemento (ya sea ADN o ARN) se puede insertar para producir la replicación de la secuencia o elemento unido. En algunas realizaciones, el vector de expresión contiene un segmento promotor constitutivamente activo (tal como, entre otros, CMV, SV40, el factor de elongación o secuencias LTR) o una secuencia de promotor inducible tales como el vector pIND inducible por esteroides (Invitrogen), donde la expresión de el ácido nucleico se puede regular. Los vectores de expresión de la invención pueden comprender además secuencias reguladoras, por ejemplo, un sitio interno de entrada del ribosoma. El vector de expresión se puede introducir en una célula por transfección, por ejemplo.

E) Procedimientos de producción de anticuerpos frente a IL-17A e IL-17F

La invención también se refiere a procedimientos para producir anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a IL-17A y a IL-17F. Los anticuerpos de la invención se pueden producir *in vitro* o *in vivo*. Una estrategia para la generación de anticuerpos contra IL-17A e IL-17F implica la inmunización de animales tanto con IL-17A como con IL-17F. En algunas realizaciones, los animales se inmunizan con la forma monomérica o multimérica de FR de tanto la IL-17A como la IL-17F. Los animales inmunizados de este modo producirán anticuerpos contra la IL-17A y la IL-17F, así como anticuerpos de reactividad cruzada contra IL-17A y contra IL-17F. Se conocen procedimientos estándar para la creación de anticuerpos monoclonales, incluyendo, entre otros, la técnica del hibridoma (véase Kohler y Milstein, (1975) Nature 256:495-497); la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (véase Kozbor y col., (1983) Immunol. Today 4:72) y la técnica del hibridoma con EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase see Cole, y col., in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 1985, pág. 77 - 96).

Tanto la IL-17A como la IL-17F se pueden purificar a partir de células o a partir de sistemas recombinantes usando diversas técnicas bien conocidas para aislar y purificar proteínas. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, tanto la IL-17A como la IL-17F se pueden aislar según el peso molecular aparente de la proteína pasando la proteína por un gel de SDS-PAGE y transfiriendo las proteínas a una membrana. Después, la banda del tamaño apropiado correspondiente a cualquiera de las proteínas puede cortarse de la membrana y usarse como inmunógeno en los animales directamente, o extrayendo primero o eluyendo la proteína de la membrana. Como un ejemplo alternativo, la proteína se puede aislar mediante cromatografía de exclusión por tamaño solo o en combinación con otros medios de aislamiento y purificación.

La invención también se refiere a procedimientos para producir anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a formas homodiméricas, heterodiméricas y/o multiméricas de la IL-17A y la IL-17F. Estas formas diferentes se pueden purificar a partir de células o a partir de sistemas recombinantes usando diversas técnicas bien conocidas para aislar y purificar proteínas. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, tanto la IL-17A como la IL-17F se pueden aislar según el peso molecular aparente de la proteína pasando la proteína por un gel de SDS-PAGE y transfiriendo las proteínas a una membrana. Después, la banda del tamaño apropiado correspondiente a cada una puede cortarse de la membrana y usarse como inmunógeno en los animales directamente, o extrayendo primero o eluyendo la proteína de la membrana. Como un ejemplo alternativo, la proteína se puede aislar mediante cromatografía de exclusión por tamaño solo o en combinación con otros medios de aislamiento y purificación.

Se dispone de otros medios en textos de referencia tales como Zola, Monoclonal Antibodies: Preparation And Use Of Monoclonal Antibodies And Engineered Antibody Derivatives (Basics: From Background To Bench) Springer-Verlag Ltd., New York, 2000; Basic Methods In Antibody Production And Characterization, Capítulo 11, "Antibody Purification Methods," Howard and Bethell, Eds., CRC Press, 2000; Antibody Engineering (Springer Lab Manual.), Kontermann and Dubel, Eds., Springer-Verlag, 2001.

Para la producción de anticuerpos *in vivo*, generalmente se inmuniza a los animales con cualquiera de IL-17A o IL-17F o una porción inmunogénica de cualquiera de ellas (por ejemplo, epítopos compartidos como se ha descrito anteriormente). El antígeno generalmente se combina con un adyuvante para estimular la inmunogenicidad. Los adyuvantes pueden variar de acuerdo a la especie utilizada para la inmunización. Ejemplos de adyuvantes incluyen, entre otros: adyuvante completo de Freund ("FCA"), adyuvante incompleto de Freund ("FIA"), geles minerales (p. ej., hidróxido de aluminio), sustancias de superficie activa (p. ej., lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones), péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana hemocyanin ("KLH"), dinitrofenol ("DNP") y adyuvantes humanos potencialmente útiles, tales como el bacilo de *Calmette-Gueri* ("BCG") y *Corynebacterium parvum*. Tales adyuvantes también son bien conocidos en la técnica. La inmunización puede llevarse a cabo usando procedimientos bien conocidos. La dosis y el régimen de inmunización dependerá de la especie de mamífero inmunizado, su estado inmune, el peso corporal, y / o el área de superficie calculada, etc. Típicamente, se toman muestras de suero sanguíneo de los mamíferos inmunizados y se analizan para determinar los anticuerpos anti-IL-17A e IL-17F utilizando ensayos de detección selectiva apropiados como se describe a continuación, por ejemplo.

Un procedimiento común para la producción de anticuerpos humanizados es injertar las secuencias de CDR de un MAb (producido por inmunización de un huésped roedor) en un esqueleto de Ig humana, y la transfección de los genes quiméricos en células de ovario de hámster chino (CHO) que a su vez producen un Ab funcional secretado por las células CHO (Shields R. L., y col., (1995) Anti-IgE monoclonal antibodies that inhibit allergen-specific histamine release. Int Arch. Allergy Immunol. 107:412 - 413). Los procedimientos descritos en la presente solicitud

son también útiles para la generación de alteraciones genéticas dentro de los genes de Ig o Ig quiméricas transfectadas dentro de las células huésped, tales como líneas celulares de roedores, plantas, levaduras y procariontes (Frigerio L, y col., (2000) Assembly, secretion, and vacuolar delivery of a hybrid immunoglobulin in plants. Plant Physiol. 123:1483 - 1494).

5 Los esplenocitos de animales inmunizados se pueden immortalizar mediante la fusión de los esplenocitos (que contienen los linfocitos N productores de anticuerpos) con una línea celular inmortal tal como una línea de mieloma. Típicamente, la línea celular de mieloma es de la misma especie que el donante de esplenocitos. En una realización, la línea celular inmortal es sensible al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). En algunas formas de realización, las células de mieloma son negativas para el virus de Epstein-Barr (EBV).
10 En realizaciones preferidas, las células de mieloma son sensibles a HAT, negativas para el virus EBV y negativas para la expresión de Ig. Se puede usar cualquier mieloma adecuado. Se pueden generar hibridomas murinos usando líneas celulares de mieloma de ratón (por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14). Estas líneas de mieloma murinas están disponibles en la ATCC. Estas células de mieloma se fusionan a, polietilenglicol ("PEG") de los esplenocitos del donante, preferentemente al polietilenglicol de 1500 de peso molecular ("PEG 1500"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan en medio HAT, que mata las células de mieloma no fusionadas y las fusionadas improproductivamente. Los esplenocitos no fusionados mueren en un corto período de tiempo en cultivo. En algunas realizaciones, las células de mieloma no expresan genes de inmunoglobulina.

Los hibridomas que producen un anticuerpo deseado detectado mediante ensayos de selección, tales como los descritos más adelante, pueden utilizarse para producir anticuerpos en cultivo o en animales. Por ejemplo, las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio nutriente en las condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que las células de hibridoma secretan los anticuerpos monoclonales en el medio de cultivo. Estas técnicas y medios de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Como alternativa, las células de hibridoma se pueden inyectar en el peritoneo de un animal no inmunizado. Las células proliferan en la cavidad peritoneal y secretan el anticuerpo, que se acumula como fluido ascítico. El fluido ascítico puede extraerse de la cavidad peritoneal con una jeringa como una fuente rica del anticuerpo monoclonal

Los hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales frente a IL-17A e IL-17F se produjeron usando procedimientos similares a los descritos anteriormente y se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas VA) de depósito de la patente como depósitos originales en virtud del Tratado de Budapest y se les dio los siguientes n° de acceso: clon 339,15,5.3 (Designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7987, depositada el 7 de noviembre de 2006); clon 339,15,3.6 (Designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7988, depositada el 7 de noviembre de 2006); y clon 339,15,6.16 (Designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7989, depositada el 7 de noviembre de 2006).

Otro procedimiento no limitante para la producción de anticuerpos humanos se describe en la patente de EE.UU. N° 5.789.650M que describe mamíferos transgénicos que producen anticuerpos de otra especie (por ejemplo, seres humanos) con sus propios genes de inmunoglobulina endógena inactivados. Los genes de los anticuerpos heterólogos están codificados por genes de inmunoglobulina humana. Los transgenes que contienen las regiones de codificación de inmunoglobulina no reordenados se introducen en un animal no humano. Los animales transgénicos resultantes son capaces de reordenar funcionalmente las secuencias de inmunoglobulina transgénicas y producir un repertorio de anticuerpos de diversos isotipos codificados por genes de inmunoglobulina humana. Los linfocitos B de los animales transgénicos se immortalizan después por cualquiera de una variedad de procedimientos, incluyendo la fusión con una línea celular immortalizada (por ejemplo, una célula de mieloma).

Los anticuerpos de la presente invención también pueden prepararse *in vitro* usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, entre otros, los anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra IL-17A e IL-17F se pueden preparar mediante el uso de esplenocitos humanos debados *in vitro* (Boerner y col., (1991) J. Immunol. 147:86 - 95).

Como alternativa, por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden preparar por "clonación de repertorio" (Persson y col., (1991) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:2432 - 2436; y Huang and Stollar (1991) J. Immunol. Methods 141:227 - 236). Además, la patente de EE.UU. N° 5.798.230 describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos de linfocitos B humanos productoras de anticuerpos que se immortalizan mediante la infección con un virus de Epstein-Barr que expresa el antígeno nuclear 2 del virus de Epstein-Barr (EBNA2). EBNA2, se requiere para la immortalización, de inactiva después y se produce un aumento de los títulos de anticuerpos.

En otra realización, los anticuerpos de la invención se forman mediante inmunización *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica ("PBMC"). Esto se puede lograr por cualquier medio conocido en la técnica, tales como, por ejemplo, usando procedimientos descritos en la literatura (Zafiroopoulos y col., (1997) J. Immunological Methods 200:181 - 190).

En una realización específica, se fabrican anticuerpos biespecíficos y monocatenarios que se unen tanto IL-17A como a IL-17F. El procedimiento comprende la fusión de células de hibridoma que secretan un anticuerpo monoclonal que se une a IL-17A, con células de hibridoma que secretan un anticuerpo monoclonal que se une a IL-

17F, preparando de este modo un hibridoma híbrido que secreta un anticuerpo monoclonal biespecífico A/F. En una realización, el procedimiento comprende la fusión de células de hibridoma que secretan un antagonista (o agonista) de MAb de IL-17A con células de hibridoma que secretan un antagonista (o agonista) de MAb de IL-17F. Las técnicas convencionales para la realización dicha fusión y para aislar el hibridoma híbrido deseado incluyen las descritos el presente documento en otra parte y las que se ilustran en los ejemplos siguientes.

La patente de EE.UU. N° 6.060.285 describe un procedimiento para la producción de anticuerpos biespecíficos, en el que al menos los genes para la cadena ligera y la parte variable de la cadena pesada de un anticuerpo que tiene una primera especificidad se transfectan en una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo que tiene una segunda especificidad. las células de hibridoma transfectadas se cultivan, se producen anticuerpos biespecíficos y se pueden aislar por diversos medios conocidos en la técnica

Otros investigadores han utilizado el acoplamiento químico de fragmentos de anticuerpo para preparar moléculas de unión a antígeno que tiene especificidad para dos antígenos diferentes (Brennan y col., Science 229:81 1985; Glennie y col., J. Immunol. 139:2367, 1987). La patente de EE.UU. N° 6.010.902 también discute técnicas conocidas en la técnica mediante las que se pueden preparar anticuerpos biespecíficos, por ejemplo mediante el uso de reactivos de reticulación heterobifuncionales tales como GMBS (succinimida maleimidobutiriloxi) o SPDP (N-succinimidil 3 - (2-piridilditio) propionato). (Véase, por ejemplo, Hardy, "Purification And Coupling Of Fluorescent Proteins For Use In Flow Cytometry", Handbook of Experimental Immunology, 4ª Ed., Volumen 1, Immunochemistry, Weir y col., (eds.), pág. 31,4 - 31,12, 1986).

La capacidad para producir anticuerpos a través de tecnología del ADN recombinante ha facilitado la producción de anticuerpos biespecíficos. Kostelny y col., utilizaron los restos de cremallera de leucina de las proteínas fos y j (que forman preferentemente heterodímeros) para producir anticuerpos biespecíficos capaces de unirse tanto a la molécula CD3 de la superficie de la célula como al receptor de la interleucina-2 (J. Immunol.148:1547; 1992).

Los anticuerpos monocatenarios se forman mediante la unión de la región variable de las cadenas ligera y pesada (región Fv) a través de un puente de aminoácido (ligador peptídico corto), que tiene como resultado una única cadena polipeptídica. Dichos Fv de cadena sencilla (scFv) se han preparado mediante la fusión de ADN que codifica un ligador peptídico entre los ADN que codifican los dos polipéptidos de la región variable (V_L y V_H). Los fragmentos de anticuerpos resultantes pueden formar dímeros u oligómeros superiores, dependiendo de factores tales como la longitud de un ligador flexible entre los dos dominios variables (Kortt y col., Protein Engineering 10:423, 1997). En realizaciones particulares, dos o más scFv se unen mediante el uso de un agente químico de reticulación.

Se pueden adaptar las técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos monocatenarios para producir anticuerpos monocatenarios de la presente invención que se unen tanto IL-17A como a IL-17F. Tales técnicas incluyen las descritas en a patente de EE.UU. N° 4.946.778; Bird (Ciencia 242:423, 1988); Huston y col., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879, 1988); y Ward y col., (Nature 334:544, 1989). Una vez identificados los anticuerpos de cadena sencilla deseados (por ejemplo, a partir de una biblioteca de expresión en fagos), los expertos en la técnica pueden manipular además el ADN que codifica el o los anticuerpos de cadena sencilla para producir anticuerpos biespecíficos, incluyendo anticuerpos biespecíficos que tienen regiones Fc.

Los anticuerpos de cadena sencilla contra la IL-17A y la IL-17F se pueden concatener en cualquier orden (es decir, anti-IL-17A-anti-IL-17F o anti-IL-17F-anti-IL-17A). En realizaciones particulares, los materiales de partida para la preparación de un anticuerpo biespecífico A / F incluyen un anticuerpo monocatenario antagonista (o agonista) dirigido contra la IL-17A y un anticuerpo monocatenarioantagonista (o agonista) dirigido contra la IL-17F.

La patente de EE.UU. N°5,582,996 divulga el uso de dominios interactivos complementarios (tales como restos de cremallera de leucina u estructuras del dominio interactivo clabe y de bloqueo) para facilitar la formación del heterodímero en la producción de anticuerpos biespecíficos. El o los dominios interactivos complementarios se pueden insertar entre un fragmento Fab y otra porción de una cadena pesada (es decir, las regiones C_{H1} o C_{H2} de la cadena pesada). El uso de dos fragmentos Fab diferentes y dominios interactivos complementarios que preferentemente heterodimerizan dará lugar a moléculas de anticuerpos biespecíficos. Los residuos de cisteína se pueden introducir en los dominios interactivos complementarios para permitir la unión con disulfuro entre los dominios interactivos complementarios y estabilizar los anticuerpos biespecíficos resultantes.

Se pueden preparar moléculas biespecíficas tetravalentes mediante la fusión del ADN que codifica la cadena pesada de un fragmento F (ab')₂. un anticuerpo con el ADN que codifica la cadena pesada de una segunda molécula de F (ab')₂ (en la que el dominio CH1, se sustituye por un dominio CH3) o con el ADN que codifica un fragmento Fv de cadena sencilla de un anticuerpo, como se describe en La patente de EE.UU. N° 5.959.083. La expresión de los genes de fusión resultantes en células de mamífero, junto con los genes para las correspondientes cadenas ligeras, produce moléculas biespecíficas tetravalentes que tienen especificidad para antígenos seleccionados.

Los anticuerpos biespecíficos también se pueden producir como se describe en la patente de EE.UU. N° 5.807.706. Generalmente, el procedimiento implica la introducción de una protuberancia en un primer polipéptido y una cavidad correspondiente en un segundo polipéptido, interfaz de polipéptidos. La protuberancia y la cavidad se colocan con el fin de promover la formación de heteromultímero y obstaculizar la formación del homomultímero. La protuberancia

se crea mediante la sustitución de aminoácidos que tienen cadenas laterales pequeñas con aminoácidos que tienen cadenas laterales más grandes. La cavidad se crea mediante el enfoque opuesto, es decir, la sustitución de aminoácidos que tienen cadenas laterales relativamente grandes con aminoácidos que tienen cadenas laterales más pequeñas.

- 5 La protuberancia y la cavidad se pueden generar mediante procedimientos convencionales para hacer sustituciones de aminoácidos en los polipéptidos. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido puede alterarse mediante técnicas convencionales de mutagénesis *in vitro*. Como alternativa, un polipéptido que incorpora una sustitución de aminoácidos deseada se puede preparar mediante síntesis de péptidos. Los aminoácidos elegidos para la sustitución se encuentran en la interfaz entre el primero y el segundo polipéptido.

10 F) Detección selectiva de especificidad del anticuerpo

La detección selectiva de anticuerpos que se unen específicamente a IL-17A e IL-17F se puede conseguir usando un ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), en el que las placas de microtitulación se reviste con IL-17A e IL-17F. En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen a IL-17A e IL-17F de clones que reaccionan de forma positiva se pueden someter también a detección selectiva según su reactividad en un ensayo basado en ELISA a otras isoformas de IGF-1R, por ejemplo IGF-1R, usando placas de microtitulación revestidas con las otras formas de IL-17A e IL-17F u otros miembros de la familia de la IL-17. Los clones que producen anticuerpos reactivos a otras formas o miembros de la familia se eliminan y los clones que producen anticuerpos reactivos a IL-17A e IL-17F sólo se pueden seleccionar por expansión y desarrollo posteriores. La confirmación de la reactividad de los anticuerpos a IL-17A e IL-17F se puede conseguir, por ejemplo, usando un ensayo de transferencia de tipo western en el que proteínas de células de cáncer de ovarios, mama, renal, colorrectal, pulmón, endometrial o cerebral y FR-alfa purificado y otras isoformas del receptor de folato se someten a un gel de SDS-PAGE y, posteriormente, se transfieren a una membrana. La membrana puede sondarse con anticuerpos anti-FR- α putativos. La reactividad con IL-17A e IL-17F y no otro miembro de la familia confirma la especificidad de la reactividad de IL-17A e IL-17F.

En algunas formas de realización, se determina la afinidad de unión de los anticuerpos de la presente invención. Los anticuerpos de la invención tienen, preferentemente, una afinidad de unión a IL-17A e IL-17F de al menos aproximadamente 1×10^{-7} M, más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-8} M, más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-9} M, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-10} M. Las células productoras de anticuerpos preferidas de la invención producen sustancialmente sólo anticuerpos que tienen una afinidad de unión a IL-17A e IL-17F de al menos aproximadamente 1×10^{-7} M, más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-8} M, más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-9} M, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-10} M. Las composiciones preferidas de la invención comprenden sustancialmente sólo anticuerpos que tienen una afinidad de unión a IL-17A e IL-17F de al menos aproximadamente 1×10^{-7} M, más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-8} M, más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-9} M, y lo más preferentemente al menos aproximadamente 1×10^{-10} M.

35 Los anticuerpos de la invención inducen preferentemente citotoxicidad celular dependiente de (ADCC) en células portadoras de IL-17RA e IL-17RC. En la técnica se conocen procedimientos de ADCC.

G) Células productoras de anticuerpos frente a IL-17A e IL-17F

Las células productoras de anticuerpos incluyen cualquier línea celular de expresión en insecto conocida, tal como, por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda*. Las líneas celulares de expresión también pueden ser líneas celulares de levadura, tales como, por ejemplo, células de *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de expresión también pueden ser células de mamífero tales como, por ejemplo, células de hibridoma (por ejemplo, células NS0), células de ovario de hámster chino, células de riñón de cría de hámster, la línea de riñón embrionario humano 293, líneas celulares de riñón de perro normal, líneas celulares renales de gato normal, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano, células COS y células G8 de mioblasto de ratón no tumorigénicas, líneas celulares de fibroblastos, líneas celulares de mieloma, células NIH/3T3 de ratón, células LMTK31, células de Sertoli de ratón, células de carcinoma cervical humano, células de hígado de rata búfalo, células de pulmón humanas, células hepáticas humanas, células de tumor mamario de ratón, células TRI, células MRC 5, y células FS4.

En algunas realizaciones preferidas, las células productoras de anticuerpos producen anticuerpos que se unen específicamente a IL-17A y a IL-17F. Las células preferentemente carecen sustancialmente de competidores de unión a IL-17A e IL-17F. En realizaciones preferidas, las células productoras de anticuerpos comprenden menos de aproximadamente 10%, preferentemente menos de aproximadamente 5%, más preferentemente menos de aproximadamente 1%, más preferentemente menos de aproximadamente 0,5%, más preferentemente menos de aproximadamente 0,1%, y lo más preferentemente 0% en peso de los competidores de unión de IL-17A e IL-17F. En algunas realizaciones preferidas, los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos carecen sustancialmente de competidores de unión de IL-17A e IL-17F. En realizaciones preferidas, los anticuerpos producidos por las células productoras de anticuerpos comprenden menos de aproximadamente 10%, preferentemente menos de aproximadamente 5%, más preferentemente menos de aproximadamente 1%, más preferentemente menos de aproximadamente 0,5%, más preferentemente menos de aproximadamente 0,1%, y lo

más preferentemente 0% en peso de los competidores de unión de IL-17A e IL-17F. Las células productoras de anticuerpos preferidas producen sustancialmente sólo anticuerpos que tienen una afinidad de unión a IL-17A e IL-17F de al menos aproximadamente $1 \times 10^{-7}M$, más preferentemente al menos aproximadamente $1 \times 10^{-8}M$, más preferentemente al menos aproximadamente $1 \times 10^{-9}M$, y lo más preferentemente al menos aproximadamente $1 \times 10^{-10}M$.

En algunas formas de realización, las células productoras de anticuerpos son los hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales frente a IL-17A e IL-17F y se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas VA) de depósito de la patente como depósitos originales en virtud del Tratado de Budapest y se les dio los siguientes nº de acceso: clon 339,15,5.3 (Designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7987, depositada el 7 de noviembre de 2006); clon 339,15,3.6 (Designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7988, depositada el 7 de noviembre de 2006); y clon 339,15,6.16 (Designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7989, depositada el 7 de noviembre de 2006).

H) Purificación de anticuerpos

Los procedimientos de purificación de anticuerpos son conocidos en la técnica. En algunas formas de realización de la invención, los procedimientos para la purificación de anticuerpos incluyen filtración, cromatografía de columna de afinidad, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y concentración. La etapa de filtración comprende preferentemente ultrafiltración y, más preferentemente, ultrafiltración y diafiltración. Preferentemente, la filtración se lleva a cabo al menos aproximadamente 5-50 veces, más preferentemente de 10 a 30 veces, y lo más preferentemente 14 a 27 veces. Cromatografía en columna de afinidad puede realizarse usando, por ejemplo, PROSEP Affinity Chromatography (Millipore, Billerica, Mass.). En una realización preferida, la etapa de cromatografía de afinidad comprende cromatografía en columna PROSEP-VA. El eluato se puede lavar con un detergente disolvente. La cromatografía de intercambio catiónico puede incluir, por ejemplo, Cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose. La cromatografía de intercambio aniónico puede incluir, por ejemplo, entre otras, Cromatografía de intercambio aniónico Sepharose Fast Flow. La etapa de intercambio de aniones es, preferentemente, sin unión, lo que permite la eliminación de los contaminantes, incluido el ADN y BSA. El producto anticuerpo se nanofiltrar, preferentemente, por ejemplo, usando un nanofiltro Pall DV 20. El producto de anticuerpo se puede concentrar, por ejemplo, usando ultrafiltración y diafiltración. El procedimiento puede comprender además una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño para eliminar los agregados.

I) Usos terapéuticos de los anticuerpos de reactividad cruzada frente a IL-17A e IL-17F

Los anticuerpos con reactividad cruzada frente a IL-17A e IL-17F se pueden utilizar para modular el sistema inmunológico al unirse a los ligandos IL-17A e IL-17F (juntos o por separado) y, por lo tanto, impedir la unión de IL-17A con IL-17RA o IL-17RC e IL-17F o con cualquier otro receptor al que se pueden unir, especialmente un miembro de la familia IL-17. Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar para modular el sistema inmunológico al inhibir la unión de la IL-17A con los receptores endógenos IL-17RA y/o IL-17RC y de IL-17F con los receptores endógenos IL-17RC. Los anticuerpos de la invención también se puede utilizar para tratar a un sujeto que produce un exceso de IL-17A y/o IL-17F. Sujetos adecuados incluyen mamíferos, tales como seres humanos. Por ejemplo, Los anticuerpos de la invención son útiles en la unión, bloqueo, inhibición, reducción, antagonismo o neutralización de la IL-17A y la IL-17F (bien por separado o bien juntos), en el tratamiento de la inflamación y de las enfermedades inflamatorias tales como psoriasis, artritis reumatoide, enteropatía inflamatoria (SII), colitis, escleriosis múltiple y otras enfermedades inflamatorias divulgadas en el presente documento.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención se unen, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan o neutralizan a la IL-17F y la IL-17A (juntas o por separado) *in vivo*.

Por lo tanto, las realizaciones particulares de la presente invención están dirigidas al uso de los anticuerpos de la invención como antagonistas en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunes tales como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria (EII) y enfermedad de Crohn.

Además, los anticuerpos de la invención son útiles para:

(1) Bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la señalización a través de la IL-17A y la IL-17F en el tratamiento de la enteropatía inflamatoria (SII), la colitis crónica y la artritis reumatoide.

(2) Bloquear, inhibir, reducir, antagonizar o neutralizar la señalización mediante IL-17A o IL-17F en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como escleriosis múltiple (EM), artritis reumatoide, EII para evitar o inhibir la señalización en células inmunitarias (p. ej., linfocitos, monocitos, leucocitos) mediante sus receptores (p. ej., IL-17RA e IL-17RC. Bloquear, inhibir, reducir o antagonizar la señalización mediante IL-17RA e IL-17RC usando los anticuerpos de la presente invención pueden también ser beneficiosos para enfermedades del páncreas, riñones, hipófisis y células neuronales. La DMID, la DMNID, la pancreatitis y el carcinoma de páncreas pueden beneficiarse. Los Mab frente a IL-17A y IL-17F pueden también ser útiles para tratar nefropatías, tales como glomeruloesclerosis, neuropatía membranosa, amiloidosis (que también afecta al riñón, entre otros tejidos), arteriosclerosis renal, glomerulonefritis de diversos orígenes, enfermedades fibroproliferativas del riñón, así como disfunción renal asociada con LES, DMDI, diabetes de tipo II (DMNID), tumores renales y otras enfermedades.

(3) Actuar como agonistas, potenciar, incrementar o iniciar la señalización mediante receptores de IL-17A o IL-17F en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como LES, artritis reumatoide y EII. Los anticuerpos monoclonales y neutralizantes anti-IL-17A e IL-17F 1 pueden señalar linfocitos u otras células inmunitarias para diferenciar, alterar la proliferación o cambiar la producción de citocinas o de proteínas de la superficie celular que mejoran la autoinmunidad. Específicamente, la modulación de la respuesta de linfocitos T colaboradora un patrón alterno de la secreción de citocinas puede desviar una respuesta autoinmunitaria para mejorar la enfermedad (Smith JA y col., J. Immunol. 160:48414849, 1998).

Los anticuerpos de la presente invención son útiles como antagonistas de las citocinas IL-17A o IL-17F. Tales efectos antagonistas pueden alcanzarse mediante neutralización directa o unión de IL-17A e IL-17F.

La inflamación es una respuesta protectora de un organismo para defenderse de un agente invasor. La inflamación es un acontecimiento en cascada que implica muchos mediadores celulares y humorales. Por un lado, la supresión de respuestas inflamatorias puede dejar a un huésped en situación de inmunocompromiso; no obstante, si no se deja sin comprobar, la inflamación puede conducir a complicaciones serias, que incluyen enfermedades inflamatorias crónicas (p. ej., psoriasis, artritis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad intestinal inflamatoria y similares), shock séptico e insuficiencia de múltiples órganos. Es importante el hecho de que estos diversos estados de enfermedad comparten mediadores inflamatorios comunes. Las enfermedades colectivas que se caracterizan por inflamación tienen un gran impacto sobre la morbilidad y la mortalidad humanas. Por lo tanto, es claro que los anticuerpos de la presente invención podrían tener un potencial terapéutico crucial para un gran número de enfermedades humanas y animales, desde el asma y la alergia a la autoinmunidad y el choque séptico.

1. Artritis

La artritis, incluida la osteoartritis, la artritis reumatoide, las articulaciones artríticas como resultado de lesiones y similares, son afecciones inflamatorias frecuentes que se beneficiarán del uso terapéutico de anticuerpos que antagoniza, neutralizan o bloquean la IL-17A y la IL-17F. Por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que afecta a todo el cuerpo y es una de las formas más frecuentes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que reviste la articulación, que produce dolor, rigidez, calor, enrojecimiento y tumefacción. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir el hueso y el cartílago. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación (sinovio) inflamado puede invadir y dañar el hueso y el cartílago, que conduce al deterioro de la articulación y a dolor intenso entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineación, lo que tiene como resultado dolor y pérdida de movimiento.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad mediada por el sistema inmunitario particularmente caracterizada por inflamación y el posterior daño tisular, que conlleva discapacidad grave y aumenta la mortalidad. En las articulaciones reumatoides se producen localmente diversas citocinas. En numerosos estudios se ha demostrado que la IL-1 y el TNF-alfa, dos citocinas proinflamatorias prototipo, desempeñan un papel importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la progresiva destrucción de la articulación. De hecho, la administración de inhibidores de TNF-alfa y de IL-1 en pacientes con AR ha conducido a una espectacular mejora de los signos clínicos y biológicos de la inflamación y a una reducción de los signos radiológicos de la erosión ósea y la destrucción de cartílago. No obstante, a pesar de estos alentadores resultados, un porcentaje significativo de los pacientes no responde a estos agentes, lo que sugiere que otros mediadores también están implicados en la fisiopatología de la artritis (Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2):135 - 149, 2002). Uno de estos mediadores podrían ser IL-17A o IL-17F y, como tal, una molécula que se une o inhibe la actividad de IL-17A o IL-17F, tal como los polipéptidos aIL-17RA, IL-17RA solubles o los anticuerpos o parejas de unión podrían servir como valiosa terapéutica para reducir la inflamación de la artritis reumatoide y otras enfermedades artríticas.

En la técnica existen varios modelos de animales para la artritis reumatoide. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se asemeja mucho a la artritis reumatoide humana. Dado que la AIC comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, la convierte en un modelo ideal para la detección selectiva de posibles compuestos antiinflamatorios humanos. El modelo de AIC es un modelo bien conocido en ratones que depende tanto de una respuesta inmunitaria como de una respuesta inflamatoria para que se produzca. La respuesta inmunitaria comprende la interacción de linfocitos B y linfocitos T CD4+ en respuesta al colágeno, que se proporciona como antígeno, y conduce a la producción de anticuerpos anti-colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de respuestas tisulares de mediadores de inflamación como consecuencia de la reacción cruzada de algunos de estos anticuerpos con el colágeno nativo de ratón y la activación de la cascada del complemento. Una ventaja del uso del modelo de AIC es que se conocen los mecanismos básicos de la patogenia. Se han identificado los epítomos relevantes de linfocitos T y linfocitos B sobre el colágeno de tipo II y se han determinado varios parámetros inmunológicos (p. ej., hipersensibilidad de tipo retardada y anticuerpos anti-colágeno) e inflamatorios (p. ej., citocinas, quimiocinas y enzimas de degradación de la matriz) relacionados con la artritis mediada por el sistema inmunológico y, por tanto, se pueden usar para evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo en el modelo de AIC (Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3:407 - 20, 1999; Williams y col., Immunol. 89:9784 - 788, 1992; Myers y col., Life Sci. 61:1861 - 78, 1997; and Wang y col., Immunol. 92:8955 - 959, 1995).

Un grupo ha demostrado que un anticuerpo contra la IL-17 de ratón reduce los síntomas en un modelo de AIC de

ratón respecto a los ratones de control, lo que demuestra conceptualmente que un anti-IL-17A puede ser beneficioso para tratar la enfermedad humana, ya que la administración de un solo antisuero de rata específico contra la IL-17 de ratón redujo los síntomas de la artritis en los animales cuando se administró preventivamente o después de que los síntomas de la artritis ya estuviesen presentes en el modelo (Lubberts y col., *Arthritis Rheum.* 50:650 - 9, 2004).

5 Por tanto, un anticuerpo que antagoniza, neutraliza o bloquea la unión de IL-17A r IL-17F a sus respectivos receptores se puede usar para neurarizar la IL-17A y/o IL-17F en el tratamiento de enfermedades humanas específicas tales como artritis, psoriasis, artritis psoriásica, endotoxemia enteropatía inflamatoria (SII), IBS, colitis y otras enfermedades inflamatorias divulgadas el presente documento.

10 La administración de anticuerpos de la invención a estos ratones modelo de AIC se utiliza para evaluar su uso como tal anticuerpo como antagonista de la IL-17F y la IL-17A, que podrían usarse para mejorar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad. A modo de ejemplo y sin limitaciones, la inyección de 10-200 ug de un anticuerpo de la presente invención por ratón (de una a siete veces a la semana durante hasta 4 semanas, aunque sin limitarse a ellas, por vía de administración s.c., i.p o i.m.) puede reducir significativamente la puntuación de la enfermedad (puntuación a la pata, aparición de inflamación o enfermedad). Dependiendo del inicio de la administración del anticuerpo (p. ej., antes o en el momento de la inmunización con colágeno o en cualquier punto de tiempo tras la segunda inmunización con colágeno, incluidos los puntos de tiempo en los que la enfermedad ya ha progresado), dichos anticuerpos anti-IL-17A e IL-17F pueden ser eficaces en la prevención de la artritis reumatoide, así como la prevención de su progresión.

2. Enfermedad intestinal inflamatoria (EII)

20 En Estados Unidos, aproximadamente 500.000 personas sufren enfermedad intestinal inflamatoria (EII) que puede afectar al colon y al recto (colitis ulcerosa) o a ambos, al intestino delgado y grueso (enfermedad de Crohn). La patogenia de estas enfermedades está poco clara, pero implican la inflamación crónica de los tejidos afectados. Los anticuerpos que se unen a IL-17A e IL-17F podrían servir como un medicamento valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la EII y enfermedades relacionadas.

25 La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, normalmente denominado colon, que se caracteriza por inflamación y ulceración de la mucosa o revestimiento interno del colon. Esta inflamación hace que el colon evacue con frecuencia, lo que tiene como resultado diarrea. Los síntomas incluyen heces sueltas y calambres abdominales asociados, fiebre y pérdida de peso. Aunque la causa exacta de la CU se desconoce, recientes investigaciones sugieren que las defensas naturales del cuerpo están funcionando contra proteínas del cuerpo que el cuerpo piensa que son extrañas (una "reacción autoinmunitaria"). Quizá proque se asemejan a las proteínas bacterianas del intestino, estas proteínas pueden instigar o estimular el proceso inflamatorio que comienza destruyendo el revestimiento del colon. Como el revestimiento del colon se destruye, se forman úlceras que liberan moco, pus y sangre. Normalmente, la enfermedad comienza en la zona rectal y, en última instancia, se puede extender a través de todo el intestino grueso. Episodios repetidos de inflamación conducen a un engrosamiento de la pared del intestino y el recto con tejido cicatricial. Con la enfermedad grave se puede producir la muerte del tejido del colon o sepsis. Los síntomas de colitis ulcerosa varían de intensidad y su inicio puede ser gradual o repentino. Los ataques pueden estar provocados por muchos factores, incluidas las infecciones respiratorias o el estrés.

40 Aunque actualmente no se dispone de cura para la CU, los tratamientos se centran sobre la supresión del proceso inflamatorio anómalo en el revestimiento del colon. Los tratamientos que incluyen inmunosupresores corticosteroides (p. ej., azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y aminosalicilatos están disponibles para tratar la enfermedad. No obstante, el uso a largo plazo de inmunosupresores, tales como corticosteroides y azatioprina, puede tener como resultado efectos secundarios graves, incluidos adelgazamiento de los huesos, cataratas, infección y efectos sobre el hígado y la médula ósea. En los pacientes en los que las terapias actuales no tienen éxito, la cirugía es una opción. La cirugía implica la extracción de todo el colon y el recto.

45 Hay varios modelos animales que pueden imitar parcialmente a la colitis ulcerosa crónica. El modelo más usado es el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenesulfónico/etanol (TNBS), que induce la inflamación crónica y ulceración del colon. Cuando se introduce TNBS en el colon de ratones susceptibles mediante instilación intrarrectal, induce respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T en la mucosa del colon, conduciendo en este caso a una inflamación mucosa masiva caracterizar por una densa infiltración de linfocitos T y macrófagos a lo largo de toda la pared del intestino grueso. Además, este cuadro histopatológico se acompaña del cuadro clínico de pérdida de peso progresiva (emaciación), diarrea sanguinolenta, prolapso rectal y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath y col. *Intern. Rev. Immunol.* 19:5162, 2000).

55 Otro modelo de colitis usa dextrano sulfato sódico (DSS), que induce una colitis aguda manifestada por diarrea sanguinolenta, pérdida de peso, acortamiento del colon y ulceración mucosa con infiltración de neutrófilos. La colitis inducida por DSS se caracteriza histológicamente mediante infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daños en las criptas focales y ulceración epitelial. Se piensa que estos cambios se desarrollan debido a un efecto tóxico del DSS sobre el epitelio y mediante fagocitosis de las células de la lámina propia y producción de TFN-alfa e IFN-gamma. A pesar de su uso común, varios problemas sobre los mecanismos del DSS en cuanto a la relevancia para la enfermedad humana siguen sin resolver. El DSS se considera un modelo independiente de linfocitos T porque se observa en animales deficientes en linfocitos T tales como ratones SCID.

60

La administración de anticuerpos de la invención a estos modelos de TNBS o DSS se puede usar para evaluar el uso de estos anticuerpos para aliviar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad gastrointestinal. Además, los resultados que muestran inhibición de IL-17A e IL-17F por dichos anticuerpos proporcionan la prueba de concepto de que los anticuerpos de la invención también se pueden usar para aliviar los síntomas en los modelos de colitis/EII y alterar el curso de la enfermedad.

3. Psoriasis

La psoriasis es una afección cutánea crónica que afecta a más de siete millones de americanos. La psoriasis se produce cuando nuevas células de la piel crecen de forma anómala, que da lugar a parches de piel inflamada, tumefacta y escamosa en los que la piel no se ha desprendido con la suficiente rapidez. La psoriasis en placas, la forma más frecuente, se caracteriza por parches inflamados de piel ("lesiones") cubiertos por escamas blancas plateadas. La psoriasis puede limitarse a pocas placas o afectar a áreas de moderadas a extensas de piel, apareciendo con más frecuencia sobre el cuero cabelludo, las rodillas, los codos y el tronco. Aunque es muy visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogenia de las enfermedades implican la inflamación crónica de los tejidos afectados. Los anticuerpos que se unen a IL-17A e IL-17F podrían servir como un medicamento valioso para reducir la inflamación y los efectos anatomopatológicos de la psoriasis, de otras enfermedades cutáneas inflamatorias, de alergias de la piel y las mucosas, y de enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno inflamatorio mediado por los linfocitos T de la piel que produce molestias considerables. Es una enfermedad para la que no hay cura y afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta a aproximadamente el dos por ciento de las poblaciones de Europa y Norteamérica. Aunque los individuos con psoriasis leve a menudo pueden controlar su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes de todo el mundo requieren terapia inmunosupresora ultravioleta o sistémica. Por desgracia, la inconveniencia y los riesgos de la radiación ultravioleta y las toxicidades de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes normalmente sufren recurrencia de la psoriasis y, en algunos casos, rebote, poco después de detener la terapia inmunosupresora.

Los anticuerpos que se unen a IL-17A e IL-17F también se pueden usar en sistemas diagnósticos para la detección de niveles circulantes de IL-17F o IL-17A y en la detección IL-17F y/o IL-17A asociado con la respuesta inflamatoria de fase aguda. Niveles elevados o disminuidos los polipéptidos ligando o receptor pueden ser indicativos de afecciones patológicas, incluida inflamación o cáncer. Se sabe que la IL-17A y la IL-17F inducen la respuesta inflamatoria asociada en la fase aguda. Además, la detección de proteínas o moléculas de fase aguda, tal como as IL-17A o IL-17F puede ser indicativa de una afección inflamatoria crónica en ciertos estados de enfermedad (p. ej., asma, psoriasis, artritis reumatoide, colitis, EII). La detección de dichas afecciones sirve para ayudar al diagnóstico de enfermedades, así como para ayudar al médico a elegir la terapia adecuada.

Además de otros modelos de enfermedad descritos en el presente documento, la actividad de los anticuerpos de la invención sobre el tejido inflamatorio derivado de lesiones psoriásicas humanas se puede medir *in vivo* usando un modelo de ratón inmunodeficiente grave combinado (SCID). Se han desarrollado varios modelos de ratones en los que células humanas se implantan en ratones inmunodeficientes (en conjunto denominados modelos de xenoinjerto); véase, por ejemplo, Cattan AR, Douglas E, Leuk. Res. 18:51322, 1994 y Flavell, DJ, Hematological Oncology 14:6782, 1996. Como modelo de xenoinjerto *in vivo* para psoriasis, tejido cutáneo psoriásico humano se implanta en el modelo de ratón SCID y se expone a un antagonista adecuado. Además, otros modelos animales de psoriasis de la técnica se pueden usar para evaluar los anticuerpos de la invención, tal como injertos cutáneos psoriásicos implantados en un modelo de ratón AGR129 y expuestos a un antagonista adecuado (véase, por ejemplo, Boyman, O. y col., J. Exp. Med. Publicación Online nº 20031482, 2004.). Los anticuerpos anti-IL-17A e IL-17F que se unen, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan o neutralizan la actividad de IL-17A e IL-17F son antagonistas preferidos. De forma similar, en el modelo SCID se pueden usar tejidos o células derivados de colitis humana, EII, artritis u otras lesiones inflamatorias para evaluar las propiedades antiinflamatorias de los anticuerpos de la invención descritos en el presente documento.

Las terapias diseñadas para abolir, retrasar o reducir la inflamación usando anticuerpos de la invención se pueden analizar mediante la administración de estos anticuerpos a ratones SCID portadores de tejido inflamatorio humano (p. ej., lesiones psoriásicas y similares) u otros modelos descritos en el presente documento. La eficacia del tratamiento se mide y evalúa estadísticamente como el efecto antiinflamatorio incrementado en la población tratada en el tiempo usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de procedimientos incluyen, entre otros, medir, por ejemplo, en un modelo de psoriasis, el engrosamiento epidérmico, el número de células inflamatorias de la dermis superior y los grados de paraqueratosis. Dichos procedimientos se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Por ejemplo, véase Zeigler, M y col. Lab Invest 81:1253, 2001; Zollner, T. M. y col. J. Clin. Invest. 109:671, 2002; Yamanaka, N. y col. Microbiol Immunol. 45:507, 2001; Raychaudhuri, S. P. y col. Br. J. Dermatol. 144:931, 2001; Boehncke, W. H y col. Arch. Dermatol. Res. 291:104, 1999; Boehncke, W. H y col., al., J. Invest. Dermatol. 116:596, 2001; Nickoloff, B. J. y col., Am. J. Pathol. 146:580, 1995; Boehncke, W. H y col., J. Cutan. Pathol. 24:1, 1997; Sugai, J., M. y col., J. Dermatol. Sci. 17:85, 1998; y Villadsen L.S. y col., J. Clin. Invest. 112:1571, 2003. La inflamación también se puede controlar en el tiempo usando procedimientos bien conocidos, tales como citometría de flujo (o PCR) para cuantificar el número de células inflamatorias o lesionales presentes en una muestra, puntuación (pérdida de peso, diarrea, hemorragia rectal, longitud del colon) para EII,

puntuación de la enfermedad en las patas y puntuación de la inflamación para el modelo de AIC AR.

Además, la psoriasis es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica que se asocia con queratinocitos epidérmicos hiperplásicos y células mononucleares infiltrantes, incluidos linfocitos T CD4+ de memoria, neutrófilos y macrófagos (Christophers, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 110:199, 1996). Actualmente se cree que los antígenos ambientales desempeñan un papel significativo en el inicio y la contribución a la patología de la enfermedad. No obstante, es la pérdida de la tolerancia a los autoantígenos lo que se piensa que participa en la patología de la psoriasis. Se piensa que las células dendríticas y los linfocitos T CD4+ desempeñan un papel importante en la presentación antigénica y el reconocimiento que media en la respuesta inmunitaria, que conduce a la patología. Recientemente se ha desarrollado un modelo de psoriasis basado en el modelo de transferencia CD4+CD45RB (Davenport y col., *Internat. Immunopharmacol.*, 2:653 - 672). Los anticuerpos de la presente invención se administran a los ratones.: La inhibición de las puntuaciones de la enfermedad (lesiones cutáneas, citocinas inflamatorias) indica la eficacia de dichos anticuerpos para la psoriasis.

4. Síndrome del intestino irritable ("SII")

El "síndrome del intestino irritable constituye una enfermedad caracterizada por dolor abdominal o malestar y un hábito intestinal errático. Los pacientes con el SII se pueden clasificar en tres grupos principales según los hábitos intestinales: aquellos con heces predominantemente sueltas o frecuentes, aquellos con heces principalmente duras o infrecuentes y aquellos con unas heces normales o variables (Talley y col., 2002). La alteración de la motilidad intestinal, las anomalías en la función epitelial, el tránsito anormal de las heces y el gas, y el estrés, pueden contribuir a los síntomas, al mismo tiempo que la hipersensibilidad visceral es una característica clave en la mayor parte de los pacientes. Los factores genéticos que afectan a la señalización del dolor y a las alteraciones en el procesamiento central de las señales aferentes se piensa que predisponen a los individuos al SII tras exposiciones medioambientales específicas. Los estudios también han demostrado que las respuestas inflamatorias en el colon pueden contribuir a un aumento de la sensibilidad del músculo liso y de los nervios entéricos y, por lo tanto, a perturbar las funciones motoras sensoriales en el intestino (Collins y col., 2001). Hay un solapamiento clínico entre el SII y la EII, describiéndose con frecuencia unos síntomas de tipo SII en los pacientes antes de diagnosticarles la EII, y unos síntomas de SII mayores de lo esperado en los pacientes con remisión de una EII establecida. Por lo tanto, estas afecciones pueden coexistir con una frecuencia mayor de la esperada, o pueden existir como un continuo, con el SII y la EII en diferentes extremos del mismo espectro. Sin embargo, se debe destacar que, en la mayoría de los pacientes con SII, las muestras de biopsia de colon aparecen normales. No obstante, el SII afecta significativamente a un gran número de personas (prevalencia en aproximadamente 16 millones de personas en el año 2000 en los EE.UU.), lo que da lugar a una carga de coste total de 1.700 millones de dólares (año 2000). Por lo tanto, entre las enfermedades y los trastornos digestivos más prevalentes y costosos, el SII es la segunda solo después de la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE). diferencia de la ERGE, el tratamiento para el SII sigue siendo insatisfactorio (Talley y col., 2002; Farhadi y col., 2001; Collins y col., 2001), lo que demuestra que el SII constituye claramente una necesidad médica insatisfecha.

Se han propuesto modelos de enfermedad coincidentes que proponen una mejora de la reactividad de los circuitos neurales, inmunitarios o neuroinmunitarios en el sistema nervioso central (SNC) o en el intestino a las perturbaciones centrales (psicosociales) o periféricas (irritación, inflamación o infección de los tejidos) de la homeostasia normal (Talley y col., 2002). Esta capacidad de respuesta reforzada da lugar a una alteración de la regulación de la motilidad intestinal, de la función epitelial (inmunitaria, permeabilidad), y una hipersensibilidad visceral, que a su vez da lugar a síntomas de SII.

Muchas moléculas diferentes pueden realizar una función en la patogenia del SII, incluida una función para las moléculas que estimulan las neuronas y las que están implicadas en el inicio del proceso inflamatorio. Se sabe que una serie de las moléculas están relacionadas con una posible actividad sobre las neuronas debido a su expresión directa en las neuronas o por la expresión de sus receptores en las neuronas, incluidas la IL-17D, la IL-17B y la IL-31. Además, una serie de miembros de la familia de la IL-17 y moléculas relacionadas se han asociado a la inflamación en el intestino, incluidas IL-17A, IL-17F, IL-23 e IL-31.

Se podría analizar la eficacia de los inhibidores/antagonistas de estas moléculas *in vivo* en modelos de animales de la enfermedad. Se han sugerido varios modelos animales que imitan las características principales del SII y que implican los estímulos centrales (estrés) o los estímulos periféricos (infección, inflamación). Dos ejemplos de modelos animales *in vivo* que se pueden utilizar para determinar la eficacia de los inhibidores en el tratamiento del SII son i) modelos que se centran en la patogenia del SII dirigida por el SNC (modelos de estrés) y ii) modelos que se centran en los inductores intestinales del estrés (es decir, inflamación, infección o esfuerzo físico del intestino). Sin embargo, se debe destacar que los acontecimientos dentro del SNC o en el tracto gastrointestinal (GI) no se producen de forma aislada y que los síntomas del SII más probablemente sean resultado de una interacción compleja entre las señales del SNC sobre el tracto GI y viceversa.

Para el uso farmacéutico, los anticuerpos de la presente invención se formulan para liberación para liberación parenteral, en particular intravenosa o subcutánea, de acuerdo con procedimientos convencionales. La administración intravenosa será mediante inyección en bolo, liberación controlada, usando, por ejemplo, mini bombas u otra tecnología adecuada, o mediante infusión en un periodo típico de una a varias horas. En general, las

5 formulaciones farmacéuticas incluirán una proteína hematopoyética en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5% en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tampón, albúmina, para prevenir la pérdida de proteínas en las superficies de los viales etc. Cuando se usa dicha
 10 terapia de combinación, las citocinas se pueden combinar en una formulación única o se puede administrar en formulaciones separadas. En la técnica se conocen bien procedimientos de formulación y se divulgan en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990. EN general, las dosis terapéuticas estarán en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg de peso del paciente al día, preferentemente 0,520 mg/kg al día, determinando la dosis exacta el médico de acuerdo con los patrones aceptados teniendo en
 15 cuenta la naturaleza y la gravedad de la afección, las características de los pacientes etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel del experto en la técnica. Normalmente, las proteínas se administrarán durante un periodo de hasta 28 días tras la quimioterapia o trasplante de médula ósea o hasta que se alcance un recuento de plaquetas de $>20.000/\text{mm}^3$, preferentemente $>50.000/\text{mm}^3$. Con más frecuencia, las proteínas se administrarán en una semana o menos, a menudo durante un periodo de uno a tres días. En general, una cantidad terapéuticamente
 20 eficaz de los anticuerpos de la presente invención es una cantidad suficiente para producir un incremento clínicamente significativo en la proliferación y/o diferenciación de células progenitoras linfoides o mieloides, que se manifestará como un incremento de los niveles circulantes de las células maduras (p. ej., plaquetas o neutrófilos). Por tanto, el tratamiento de los trastornos de las plaquetas continuará hasta alcanzar un recuento de plaquetas de al menos $20.000/\text{mm}^3$, preferentemente $>50.000/\text{mm}^3$. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden administrar en combinación con otras citocinas, tales como IL-3, IL-6 e IL-11, el factor de células madre, eritropoyetina, G-CSF y GM-CSF. En los regímenes de las terapias de combinación, las dosis diarias de otras citocinas serán, en general: EPO, 150 U/kg; GM-CSF, 5 - 15 lg/kg; IL-3, 1 - 5 lg/kg; y G-CSF, 1 - 25 lg/kg. . Por ejemplo, la terapia de combinación con EPO está indicada en pacientes anémicos con niveles bajos de EPO.

25 En general, la dosis de los anticuerpos administrados variará en función de factores tales como la edad del paciente, el peso, la latura, el sexo, el estado médico general y el historial médico anterior. Normalmente es deseable proporcionar al receptor una dosis de los anticuerpos que esté en el intervalo de aproximadamente 1 pg/kg a 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del paciente), aunque según lo dicten las circunstancias también se puede administrar una dosis menor o mayor.

30 La administración de los anticuerpos de la invención a un sujeto puede ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapleural, intratecal, mediante perfusión a través de un catéter regional o mediante inyección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas mediante inyección, la administración puede ser mediante infusión continua o mediante uno o múltiples bolos.

Vías de administración adicionales incluyen oral, mucosa-membrana, pulmonar y transcutánea. La liberación oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteínicas, microesferas de policianoacrilato y sistemas basados en lípidos (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins," en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hrendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)). La viabilidad de una liberación intranasal se pone de manifiesto mediante un modo tal como la administración de insulina (véase, por ejemplo, Hinchcliffe y Illum, Adv. Drug Deliv. Rev. 35:199 (1999)). Se pueden preparar partículas secas o líquidas que comprenden anticuerpos de la invención y se inhalan con la ayuda de dispensadores de polvo seco, generadores de aerosol líquido o nebulizadores (p. ej., Pettit y Gombotz, TIBTECH 16:343 (1998); Patton y col., Adv. Drug Deliv. Rev. 35:235 (1999)). Esta estrategia se ilustra con el sistema de gestión de la diabetes AERZ, que es un inhalador electrónico manual que libera insulina en aerosol en los pulmones. Los estudios han mostrado que las proteínas tan grandes como de 48.000 kDa se han liberado sobre la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonidos de baja frecuencia, lo que ilustra la viabilidad de la administración transcutánea (Mitragotri y col., Science 269:850 (1995)). La liberación transdérmica usando electroporación proporciona otro medio de administrar una molécula que tiene actividad de unión IL-17A e IL-17F (Potts y col., Pharm. Biotechnol. 10:213 (1997)).

50 Se puede formular una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, de modo que las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19 Edición (Mack Publishing Company 1995).

55 Para los fines de terapia, los anticuerpos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación de una molécula terapéutica de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia tiene como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia la respuesta inflamatoria. El tratamiento eficaz se puede evaluar de varios modos: En una realización, tratamiento eficaz se determina por la inflamación reducida. En otras realizaciones, el tratamiento eficaz está marcado por la

inhibición de la inflamación. En otras realizaciones, la terapia eficaz se mide por el aumento de bienestar del paciente, incluyendo signos tales como aumento de peso, recuperación de la fuerza, disminución del dolor, progreso y las indicaciones subjetivas del paciente de una salud mejor.

Una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la invención se puede proporcionar en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables y suspensiones orales. Ejemplos de formas sólidas incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas miniosmóticas e implantes (Bremer y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95123 (CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 239254 (Plenum Press 1997)); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 93 - 117 (Plenum Press 1997)).

Los liposomas proporcionan un medio para liberar polipéptidos terapéuticos a un sujeto mediante administración intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o administración oral, inhalación o intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos (véase en general, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993), and Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," in *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3 - 24 (CRC Press 1995)). Los liposomas tienen una composición similar a las membranas celulares y, como resultado, los liposomas se pueden administrar de forma segura y son biodegradables. En función del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar de tamaño, con diámetros que varían de 0,02 μm a más de 10 μm . Diversos agentes se pueden encapsular en liposomas: Reparto de los agentes hidrófobos en las bicapas y reparto de los agentes hidrófilos en el(los) espacio(s) acuoso(s) interno(s), (véase, por ejemplo Machy y col., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro y col., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño de los liposomas, el número de bicapas, la composición lipídica, así como las características de carga y de superficie de los liposomas.

Los liposomas se pueden adsorber en prácticamente cualquier tipo de célula y liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma adsorbido se puede ser endocitado por las células fagocíticas. Tras la endocitosis se produce la degradación dentro de los liposomas de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphof y col., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Tras la administración intravenosa, normalmente, los liposomas pequeños (de 0,1 a 1,0 μm) son captados por las células del sistema retículo-endotelial, localizado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0 μm se depositan en los pulmones. Esta captación preferencial de los liposomas más pequeños por las células del sistema retículo-endotelial se ha usado para liberar agentes quimioterapéuticos a los macrófagos y a los tumores hepáticos.

El sistema retículo-endotelial puede rodearse mediante varios procedimientos, incluidos saturación con dosis grandes de partículas de liposomas o inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos (Claassen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). Además, se ha demostrado que la incorporación de fosfolípidos derivados con glicolípidos o polietilenglicol en las membranas de los liposomas tiene como resultado una captación significativamente reducida por el sistema retículo-endotelial (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Los liposomas también se pueden preparar para apuntar a células u órganos concretos variando la composición en fosfolípidos o mediante la inserción de receptores o ligandos en los liposomas. Por ejemplo, los liposomas, preparados con un contenido elevado de un tensioactivo no iónico, se han usado para dirigirse al hígado (Hayakawa y col., patente japonesa 04-244,018; Kato y col., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja, α -tocoferol y aciete de ricino etoxilado hidrogenado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla al vacío y, después, reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha demostrado que una formulación en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) se puede dirigir al hígado (Shimizu y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).

Como alternativa, varios ligandos dirigidos se pueden unir a la superficie del liposoma, tal como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hidratos de carbono, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas se pueden modificar con derivados de galactosilípido de tipo ramificado para apuntar a los receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente sobre la superficie de las células hepáticas (Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). De forma similar, Wu y col., *Hepatology* 27:772(1998), han mostrado que marcando los liposomas con asialofetuína se producía una semivida en plasma del liposoma más corta y potenciaba considerablemente la captación de liposomas marcados con asialofetuína por los hepatocitos. Por otro lado, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosilípido de tipo ramificado se puede inhibir mediante preinyección de asialofetuína (Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Los liposomas de seroalbúmina poliaconitilada proporcionan otra estrategia para dirigir liposomas a células hepáticas (Kamps y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681 (1997)).

Además, Geho, y col., patente de EE.UU. n.º 4.603.044, describen un sistema de liberación de vesículas liposomales dirigidas a los hepatocitos que tiene especificidad por receptores hepato biliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.

5 En una estrategia más general para los tejidos, las células diana se marcan previamente con anticuerpos biotinilados específicos de un ligando expresado por la célula diana (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). Tras la eliminación del plasma de los anticuerpos libres se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otra estrategia, los anticuerpos dirigidos están unidos directamente en los liposomas (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)).

10 Los polipéptidos y anticuerpos se pueden encapsular dentro de los liposomas usando técnicas estándar de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson y col., *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Anderson y col., *Cancer Res.* 50: 1853 (1990), y Cohen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991), Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in *Liposome Technology*. 2ª Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef y col., *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). Como se ha indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

15 Se han diseñado microesferas poliméricas degradables para mantener niveles sistémicos elevados de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables, tales como poli(lactida-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(ortoésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en las que hay proteínas atrapadas en el polímero (Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 5193 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 4592 (Plenum Press 1997); Bartus y col., *Science* 281:1161 (1998); Putney y Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997)).

20 La presente invención también contempla polipéptidos químicamente modificados que tienen actividad de unión a IL-17A y a IL-17F, tales como los anticuerpos anti-IL-17A e IL-17F, que un polipéptido está unido a un polímero, como se ha tratado en lo que antecede.

25 Los expertos en la técnica pueden concebir otras formas de dosificación, como se muestra en, por ejemplo, Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro(ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19 Edición (Mack Publishing Company 1995), y en Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

30 A modo de ilustración, las composiciones farmacéuticas se pueden proporcionar como un kit que comprende un contenedor que comprende un anticuerpo de la invención. Se pueden proporcionar los anticuerpos de la invención en forma de una solución inyectable para una o múltiples dosis o como un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, dicho kit puede incluir un dispensador de polvo seco, un generador de aerosoles líquidos o un nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Dicho kit puede además comprender información escrita sobre indicaciones y usos de la composición farmacéutica. Además, dicha información puede incluir una declaración de que la composición de anticuerpo está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad conocida a IL-17A e IL-17F.

35 Una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos de la invención se puede proporcionar en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables, aerosoles, gotas, soluciones topológicas y suspensiones orales. Ejemplos de formas sólidas incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas miniosmóticas e implantes (Bremer y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95123 (CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 239254 (Plenum Press 1997)); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 93 - 117 (Plenum Press 1997)). Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones topológicas y similares.

40 Los liposomas proporcionan un medio para liberar polipéptidos terapéuticos a un sujeto mediante administración intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o administración oral, inhalación o intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodea compartimentos acuosos (véase, en general, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993), y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," en *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), páginas 3 - 24 (CRC Press 1995)). Los liposomas tienen una composición similar a las membranas celulares y, como resultado, los liposomas se pueden administrar de forma segura y son biodegradables. En función del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar de tamaño, con diámetros que varían de 0,02 µm a más de 10 µm.

Diversos agentes se pueden encapsular en liposomas: Reparto de los agentes hidrófobos en las bicapas y reparto de los agentes hidrófilos en el(los) espacio(s) acuoso(s) interno(s), (véase, por ejemplo Machy y col., *Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), y Ostro y col., *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño de los liposomas, el número de bicapas, la composición lipídica, así como las características de carga y de superficie de los liposomas.

Los liposomas se pueden adsorber en prácticamente cualquier tipo de célula y liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma adsorbido se puede ser endocitado por las células fagocíticas. Tras la endocitosis se produce la degradación dentro de los lisosomas de los lípidos liposomales y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphof y col., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). Tras la administración intravenosa, normalmente, los liposomas pequeños (de 0,1 a 1,0 μm) son captados por las células del sistema retículo-endotelial, localizado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0 μm se depositan en los pulmones. Esta captación preferencial de los liposomas más pequeños por las células del sistema retículo-endotelial se ha usado para liberar agentes quimioterapéuticos a los macrófagos y a los tumores hepáticos.

El sistema retículo-endotelial puede rodearse mediante varios procedimientos, incluidos saturación con dosis grandes de partículas de liposomas o inactivación selectiva de macrófagos por medios farmacológicos (Claassen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). Además, se ha demostrado que la incorporación de fosfolípidos derivados con glicolípidos o polietilenglicol en las membranas de los liposomas tiene como resultado una captación significativamente reducida por el sistema retículo-endotelial (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Los liposomas también se pueden preparar para apuntar a células u órganos concretos variando la composición en fosfolípidos o mediante la inserción de receptores o ligandos en los liposomas. Por ejemplo, los liposomas, preparados con un contenido elevado de un tensioactivo no iónico, se han usado para dirigirse al hígado (Hayakawa y col., patente japonesa 04-244,018; Kato y col., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidilcolina de soja, α -tocoferol y aceite de ricino etoxilado hidrogenado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla al vacío y, después, reconstituyendo la mezcla con agua. También se ha demostrado que una formulación en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de esterilglucósido derivado de soja (SG) y colesterol (Ch) se puede dirigir al hígado (Shimizu y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).

Como alternativa, varios ligandos dirigidos se pueden unir a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, de la presente invención, fragmentos de anticuerpos, hidratos de carbono, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas se pueden modificar con derivados de galactosilípido de tipo ramificado para apuntar a los receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente sobre la superficie de las células hepáticas (Kato y Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). De forma similar, Wu y col., *Hepatology* 27:772(1998), han mostrado que marcando los liposomas con asialofetuína se producía una semivida en plasma del liposoma más corta y potenciaba considerablemente la captación de liposomas marcados con asialofetuína por los hepatocitos. Por otro lado, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosilípido de tipo ramificado se puede inhibir mediante preinyección de asialofetuína (Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Los liposomas de seroalbúmina poliacetonilada proporcionan otra estrategia para dirigir liposomas a células hepáticas (Kamps y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681 (1997)). Además, Geho, y col., patente de EE.UU. n° 4.603.044, describen un sistema de liberación de vesículas liposomales dirigidas a los hepatocitos que tiene especificidad por receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.

En una estrategia más general para los tejidos, las células diana se marcan previamente con anticuerpos biotinilados específicos de un ligando expresado por la célula diana (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). Tras la eliminación del plasma de los anticuerpos libres se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otra estrategia, los anticuerpos dirigidos están unidos directamente en los liposomas (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)).

Los anticuerpos de la invención se pueden encapsular dentro de los liposomas usando técnicas estándar de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson y col., *Infect. Immun.* 31:1099

(1981), Anderson y col., *Cancer Res.* 50: 1853 (1990), y Cohen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991), Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in *Liposome Technology*. 2ª Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef y col., *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). Como se ha indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener diversos componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Se han diseñado microesferas poliméricas degradables para mantener niveles sistémicos elevados de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables, tales como poli(lactida-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli(ortoésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en las que hay

proteínas atrapadas en el polímero (Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 5193 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), páginas 4592 (Plenum Press 1997); Bartus y col., *Science* 281:1161 (1998); Putney y Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col., *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997)).

Los expertos en la técnica pueden formular otras formas farmacéuticas, como se muestra, por ejemplo, en Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 5ª Edición (Lea & Febiger 1990), Gennaro(ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19 Edición (Mack Publishing Company 1995), y en Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

La presente invención contempla composiciones de anticuerpos en las que dichos anticuerpos se unen a IL-17A e IL-17F, y procedimientos y usos terapéuticos que comprenden un anticuerpo como se describe en el presente documento. Dichas composiciones pueden comprender, además, un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Ejemplos de vehículos incluyen agua, solución tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares.

La invención se ilustra de forma adicional mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

El ARNm de IL-17F está regulada por aumento en un modelo murino de asma

Los niveles de mRNA de IL-17F se midieron en un modelo de sensibilización y exposición de las vías respiratorias en ratones. Los grupos de ratones, de 8 a 10 semanas de edad, se sensibilizaron mediante inyección intraperitoneal de 10 ug del alérgeno recombinante *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 (DerP1) (Indoor biotechnologies, Cardiff, Reino Unido) en 50% de alu. iny. (Pierce) en los días 0 y 7. Siete días más tarde, los ratones fueron expuestos 3 días consecutivos (días 14, 15 y 16) a 20 ug de DerP1 en 50 ul de PBS. Había 4 ratones que representan a este grupo. Los controles negativos incluyeron 5 ratones que recibieron sensibilización con solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguida de exposición a PBS Además de 3 ratones que recibieron sensibilización con DerP1, seguida de exposición a PBS. Cuarenta y ocho horas después de la exposición al alérgeno o al control, se extrajo todo de tejido pulmonar y se aisló el ARN total.

El ADNc de la primera hebra se preparó utilizando cantidades idénticas de ARN total de cada sujeto. Se realizó PCR de la IL-17 usando el kit Qiagen hotstar polymerase (Qiagen, Valencia, CA) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La PCR de la IL-17F utilizó 35 ciclos de amplificación con cebador sentido, zc46098 (SEC ID N° 9) y el cebador antisentido zc46099 (SEC ID N° 10). Con el fin de establecer que la calidad del molde era uniforme entre todos los sujetos, se aplicó PCR de la beta-actina a la misma cantidad de cada molde utilizado en la amplificación de IL-17F. La PCR de la beta-actina incluyó 25 ciclos de amplificación por PCR con cebador sentido, zc46098 (SEC ID N° 11) y el cebador antisentido zc46099 (SEC ID N° 12).

Los 4 ratones del grupo de tratamiento sensibilizado a DerP1, expuesto a DerP1 (la simulación de asma) mostraron una sólida amplificación de IL-17F. Por el contrario, se observó una débil amplificación de IL-17F en los controles negativos, incluidos 3 de 3 sujetos que representan el grupo de tratamiento sensibilizado a DerP1 /expuesto a PBS y 5 de 5 sujetos del grupo de tratamiento sensibilizado a PBS/expuesto a PBS. La amplificación B actina fue al menos tan sólida para los controles negativos que para el sujeto con asma simulada, lo que demuestra que la débil amplificación del control negativo de IL-17F no se debió a problemas del molde.

Ejemplo 2

La IL-17A induce niveles elevados de IFN-gamma y TNF-alfa en células mononucleares de sangre periférica humana

Las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) humana se purifican por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll y después se incuban durante la noche a 37 ° C solo en medio solo, 50 ng / ml anticuerpo anti-CD3 humano, o la combinación de 50 ng / ml del anticuerpo anti-CD3 humano ml más 1 □ g / ml de anticuerpo anti-CD28 humano. Se duplican los cultivos para cada una de estas condiciones y no se administra ninguna citoquina, 25 ng / ml de IL-17A o 25 ng / ml de IL-17F humana. Después de incubaciones de 24 horas, los sobrenadantes de cada cultivo se recogieron y se analizó su contenido de citocinas usando citometría de bolas humana de BD Bioscience (CBA). Los inventores han hallado que los cultivos que habían sido estimulados con los anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3 más anti-CD28 y suplementados con IL-17A contenían niveles significativamente elevados de IFN-gamma y TNF-alfa (se multiplican por 3-5-veces cada uno) sobre los cultivos sin citocinas añadidas o los que recibieron IL-17F. Los cultivos en los que no se añadió la estimulación anti-CD3 no mostraron cambios significativos en los niveles de citocinas. Además, la adición de IL-17A no indujo cambios significativos en otras citocinas analizadas con

CBA, incluyendo IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10. Estos datos indican que la IL-17A, pero no la IL-17F, puede aumentar la producción de IFN-gamma y de TNF-alfa en cultivos de PBMC estimulados con anti-CD3 o anti-CD3 más anti-CD28.

Ejemplo 3

5 **Un anticuerpo anti-IL-17A e IL-17F disminuye la incidencia y la progresión de la enfermedad en un modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) en ratón**

A) Modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) en ratones

Los ratones macho DBA/1J de 10 semanas de edad (Jackson Labs) se distribuyen en 3 grupos de 13 ratones/grupo. El día -21 se administró a los animales una inyección intradérmica en la cola de 50-100 µl de colágeno de tipo II de pollo de 1 mg/ml formulado en adyuvante completo de Freund (preparado por Chondrex, Redmond, WA), y tres semanas después, en el día 0, se les administró la misma inyección salvo que preparada en el adyuvante incompleto de Freund. Un anticuerpo de la invención (p. ej., un anticuerpo con reactividad cruzada o anticuerpo biespecífico) se administra como una inyección intraperitoneal 3 veces a la semana durante 4 semanas, en diferentes momentos que van desde el día 0 hasta el día en el que la mayoría de los ratones muestran unos síntomas moderados de la enfermedad. Los grupos reciben o bien 10 µg o bien 100 µg del anticuerpo por animal por dosis, y los grupos de control reciben el control de vehículo, PBS (Life Technologies, Rockville, MD). Los animales comenzaron a mostrar síntomas de artritis después de la segunda inyección de colágeno, y la mayoría de los animales sufrió una inflamación en el plazo de 1,5-3 semanas. La magnitud de la enfermedad se evalúa en cada pata mediante un calibrador para medir el grosor de la pata, y asignando una puntuación clínica (0-3) a cada pata: 0 = normal, 0,5 = dedo(s) inflamado(s), 1 = inflamación leve de la pata, 2 = inflamación moderada de la pata, y 3 = inflamación intensa de la pata como se detalla más adelante.

B) Monitorización de la enfermedad

Los animales pueden comenzar a mostrar signos de inflamación de la pata poco después de la segunda inyección de colágeno y algunos animales pueden incluso comenzar a tener signos de inflamación de los dedos antes de la segunda inyección. La mayoría de los animales desarrolla artritis en el plazo de 1,5 a 3 semanas desde la inyección de refuerzo, pero algunos requieren más tiempo. La incidencia de la enfermedad en este modelo es típicamente del 95 al 100%, y en los estudios con 40 animales se observan típicamente de 0 a 2 no respondedores (determinado después de 6 semanas de observación). Obsérvese que a medida que comienza la inflamación, es frecuente que aparezca una inflamación transitoria de la pata o de algún dedo con intensidad baja variable. Por este motivo, no se considera que un animal sufra la enfermedad establecida hasta que haya aparecido una hinchazón de la pata persistente y marcada.

Los animales se observan a diario para valorar el estado de la enfermedad de sus patas, que se hace asignando una puntuación clínica cualitativa a cada pata. Cada día se puntúan las 4 patas de todos los animales según el estado clínico de la enfermedad. Para determinar la puntuación clínica, se puede pensar que la pata tiene 3 zonas: los dedos, la propia pata (delantera o trasera) y la articulación de la muñeca o tobillo. La magnitud y la intensidad de la inflamación relativa a estas zonas se anota con: observación de la inflamación en cada dedo; desgarros o enrojecimientos de las uñas de los dedos; indicación de cualquier indicio de edema o enrojecimiento en alguna de las patas; indicación de cualquier pérdida de delimitación anatómica fina de los tendones o los huesos; evaluación de la muñeca o el tobillo en busca de edema o enrojecimiento; e indicación de si la inflamación se extiende hacia arriba por la pata. Una puntuación de pata de 1, 2 o 3 se basa primero en la impresión general de la intensidad y después en cuántas zonas están afectadas. La escala que se utiliza para la puntuación clínica se muestra a continuación:

C) Puntuación clínica

0 = Normal

0,5 = uno o más dedos afectados, pero solo están inflamados los dedos

45 1 = inflamación leve que afecta a la pata (1 zona) y puede afectar a uno o más dedos

2 = inflamación moderada de la pata y puede afectar algunos de los dedos y la muñeca o tobillo (2 zonas)

3 = inflamación intensa de la pata, muñeca o tobillo y parte o todos los dedos (3 zonas)

50 La enfermedad establecida se define como una puntuación cualitativa de la inflamación de la pata de categoría 2 o más que persiste durante dos días seguidos. Una vez que la enfermedad establecida está presente, se anota la fecha y se designa como el primer día del animal con "enfermedad establecida".

Se recoge sangre a lo largo del experimento para vigilar la concentración en el suero de los anticuerpos contra el colágeno, así como la concentración de citocinas e inmunoglobulinas. Los anticuerpos contra el colágeno del suero se correlacionan bien con la gravedad de la enfermedad. Se sacrifica a los animales el día 21 y se extrae la sangre para obtener el suero y el hemograma completo. De cada animal se extrae una pata en NBF al 10% para estudios

5 histológicos y otra se congela en nitrógeno líquido y se guarda a -80°C para analizar el ARNm. También se recogen en RNAlater® medio bazo, medio timo, medio ganglio linfático mesentérico, un lóbulo hepático y el riñón izquierdo para el análisis del ARN, y se recogen medio bazo, medio timo, medio ganglio linfático mesentérico, el resto del hígado y el riñón derecho en NBF al 10% para el estudio histológico. El suero se extrae y se congela a -80°C para los ensayos de inmunoglobulinas y citocinas.

10 Los grupos de ratones que recibieron en anticuerpo de la invención en todos los puntos temporales se caracterizaron por un retraso en el comienzo y/o la progresión de la inflamación de la pata. Estos resultados indican que un anticuerpo biespecífico y/o de reactividad cruzada anti IL-17A e IL-17F puede reducir la inflamación, así como la incidencia y la progresión de la enfermedad asociada a este modelo. Estos resultados están apoyados además por la observación de que la administración de dicho anticuerpo dio lugar a una disminución de los niveles en suero de TNF α , IL-1b, y de los anticuerpos contra el colágeno.

Ejemplo 4

Un anticuerpo anti-IL-17A e IL-17F disminuye la incidencia y la progresión de la enfermedad en un modelo de enfermedad intestinal inflamatoria (EII) en ratón

15 Este modelo está diseñado para mostrar que el tejido intestinal cultivado de los pacientes con EII produce niveles más altos de mediadores inflamatorios en comparación con los tejidos de los controles sanos. Este aumento de la producción de los mediadores inflamatorios (que incluyen, entre otros, IL-1b, IL4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A y F, IL-18, IL-23, TNF- α , IFN- γ , miembros de la familia MIP, MCP-1, G-CSF, GM-CSF, etc.) contribuye a los síntomas y a la patología asociadas a las EII, tales como la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) mediante su(s) efecto(s) sobre la activación de las vías inflamatorias y de las células efectoras posteriores. Estas vías y componentes conducen entonces a la destrucción o el daño de células y tejidos observada *in vivo*. Por lo tanto, este modelo puede simular este aspecto potenciado de mediador inflamatorio de la EII. Adicionalmente, cuando el tejido intestinal de los controles sanos o de las estirpes de células epiteliales intestinales (CEI) humanas se cultiva en presencia de estos componentes inflamatorios, se puede observar la señalización de las vías inflamatorias, así como indicios de daños celulares y tisulares.

Los tratamientos que podrían resultar eficaces en las EII humanas *in vivo* también servirían en los modelos de CEI o *ex vivo* anteriores al inhibir y/o neutralizar la producción y/o presencia de mediadores inflamatorios.

30 En este modelo, el tejido intestinal humano se recoge de pacientes con una EII o de controles sanos sometidos a una biopsia intestinal, a una resección o a la recolección del tejido en la autopsia, y se procesa con una modificación de Alexakis y col., (Gut 53: 85-90, 2004). En condiciones asépticas, las muestras se limpian cuidadosamente con una cantidad generosa de PBS y luego se cultivan en pequeñas secciones de tejido en presencia de medio de cultivo tisular completo (más antibióticos para evitar un crecimiento excesivo de bacterias). Las muestras del mismo grupo de trocitos de tejido se tratan con uno de los siguientes: vehículo (PBS): IL-17A humana recombinante (rh); rhIL-17F; o rhIL-17A + rhIL-17F. Además, estas se tratan con o sin un anticuerpo de la invención (p. ej., un anticuerpo biespecífico o con reactividad cruzada). Este protocolo experimental va seguido de estudios con estirpes de CEI humanas, con la excepción de que las células se cultivan a partir de las reservas existentes. Después de varios tiempos de cultivo (de 1 hora a varios días), se recogen los sobrenadantes y se analizan los niveles de mediadores inflamatorios, incluidos los indicados en lo que antecede. En las muestras de los pacientes con EII o en las muestras tratadas con rhIL-17A y/o F, los niveles de citocinas y quimiocinas inflamatorias están elevados en comparación con las muestras de tejido de controles sanos sin tratar. La adición de un anticuerpo de la invención reduce marcadamente la producción de mediadores inflamatorios y, por tanto, cabría esperar que fueran eficaces en la EII humana.

Ejemplo 5

Un anticuerpo anti-IL-17A e IL-17F disminuye la incidencia y la progresión de la enfermedad en un modelo de esclerosis múltiple (EM)

45 La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad compleja que se cree que está mediada por numerosos factores, incluida la presencia de infiltrados inflamatorios de células mononucleares y linfocíticas, y la desmielinización del SNC. Las células de microglía son células de tipo macrófago que pueblan el sistema nervioso central (SNC) y que se activan por lesiones o infecciones. Se ha asignado a las células de microglía funciones importantes en diversas enfermedades del SNC, incluida la EM, y se podrían utilizar para estudiar el(los) mecanismo(s) de inicio, progresión y tratamiento de la enfermedad (Nagai y col., Neurobiol Dis 8:1057 - 1068; 2001; Olson y col., J Neurosci Methods 128:33 - 43; 2003). Por lo tanto, las estirpes de células de microglía humanas inmortalizadas y/o las estirpes de astrocitos humanos establecidos se pueden utilizar para estudiar algunos de los efectos de los mediadores inflamatorios sobre estos tipos de células y su potencial para la neutralización. Los mediadores inflamatorios (que incluyen, entre otros, IL-1b, IL4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A y F, IL18, IL-23, TNF- α , IFN- γ , miembros de la familia MIP, RANTES, IP-10, MCP-1, G-CSF, GM-CSF, etc.) pueden contribuir a los síntomas y a la patología asociadas a la EM mediante su(s) efecto(s) sobre la activación de las vías inflamatorias y de las células efectoras posteriores.

Para evaluar las acciones proinflamatorias de la IL-17A y la IL-17F, y la capacidad de un anticuerpo de la invención para neutralizar o disminuir estos efectos, se tratan las células de la glía con uno de los siguientes: vehículo; rhIL-17A; rhIL-17F; rhIL-17A + IL-17F. Además, se tratan con o sin un anticuerpo de la invención. Después de varios tiempos de cultivo (de 1 hora a varios días), se recogen los sobrenadantes y las células y se analizan los niveles y/o la expresión de mediadores inflamatorios, incluidos los indicados en lo que antecede. Los niveles de las citocinas y quimiocinas inflamatorias están elevados en presencia de la rhIL-17A y/o la IL-17F en comparación con los cultivos tratados sólo con vehículo. La adición de anticuerpos de la presente invención reduce marcadamente la producción y la expresión de mediadores inflamatorios y, por tanto, cabría esperar que fueran eficaces en los aspectos inflamatorios asociados a la EM humana.

10 Ejemplo 6

Un anticuerpo anti-IL-17A e IL-17F disminuye la incidencia y la progresión de la enfermedad en un modelo de artritis reumatoide (AR) y de artrosis

Este modelo está diseñado para demostrar que los cultivos sinoviales humanos (que incluyen macrófagos sinoviales, fibroblastos sinoviales y condrocitos articulares) y explantes de pacientes con AR y artrosis producen niveles más altos de mediadores inflamatorios en comparación con los cultivos/explantes de los controles sanos. Esta producción reforzada de mediadores inflamatorios (incluidos, pero sin limitarse a ellos, oncostatina M, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17A y F, IL-18, IL-23, TNF-a, IFN-g, IP10, RANTES, RANKL, miembros de la familia MIP, MCP-1, G-CSF, GM-CSF, óxido nítrico, etc.) contribuye a los síntomas y la patología asociada a la AR y a la artrosis por medio de su(s) efecto(s) sobre la activación de las vías inflamatorias y de las células efectoras posteriores. A continuación, estos componentes y vías producen infiltrados inflamatorios, pérdida o destrucción del cartílago y de la matriz, disminución de la masa ósea e inducción de las prostaglandinas y las ciclooxigenasas. Por lo tanto, este modelo puede simular los aspectos inflamatorios destructivos de la AR y la artrosis en experimentos *in vitro* y *ex vivo*. Además, cuando los cultivos sinoviales y de explantes de controles sanos se hacen crecer en presencia de varios de estos compuestos inflamatorios (por ejemplo, oncostatina M, TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-17A y F, IL-15, etc), se puede observar una transducción de señales a través de las vías inflamatorias. Los tratamientos que podrían resultar eficaces en la AR humana *in vivo* también servirían en los modelos *in vitro* y *ex vivo* anteriores al inhibir y/o neutralizar la producción y/o presencia de mediadores inflamatorios.

En este modelo, se recogen explantes sinoviales humanos de pacientes con AR, artrosis o de controles sanos que se someten a una artroplastia o de tejidos procedentes de autopsias y se procesan mediante una modificación de Wooley y Tetlow (Arthritis Res. 65 - 70; 2000) y van 't Hof y col., (Rheumatology 39:1004 - 1008; 2000). También se estudian cultivos de fibroblastos sinoviales, macrófagos sinoviales y condrocitos articulares. Las muestras duplicadas se tratan con uno de los siguientes: vehículo (PBS); IL-17A recombinante humana (rh); rhIL-17F; o rhIL-17A + rhIL-17F y algunas muestras contienen varias combinaciones de oncostatina M, TNF-a, IL-1b, IL-6, IL-17A, IL-17F e IL-15. Además, se tratan con o sin un anticuerpo de la invención. Después de varios tiempos de cultivo (de 1 hora a varios días), se recogen los sobrenadantes y se analizan los niveles de mediadores inflamatorios, incluidos los indicados en lo que antecede. En las muestras de los pacientes con AR o artrosis o en las muestras tratadas con rhIL-17A y/o F (solas o junto a otras citocinas inflamatorias), aumenta la cantidad de citocinas y quimiocinas inflamatorias en comparación con explantes de control sanos sin tratar o con cultivos de células sin tratar. La adición de anticuerpos de la invención reduce marcadamente la producción de mediadores inflamatorios y, por tanto, cabría esperar que fueran eficaces en la AR y la artrosis humanas.

Ejemplo 7

Expresión de IL-17A e IL-17F en modelos murinos de enfermedad

Se analizaron cuatro modelos de enfermedad murinos (asma, colitis inducida por DDS, dermatitis atópica y encefalomiелitis alérgica experimental) mediante las técnicas conocidas para expresar IL-17A e IL-17F.

45 En el modelo de asma, la IL-17A y la IL-17F se expresan a unos niveles muy bajos o incluso indetectables en los pulmones, el bazo, los ganglios linfáticos drenantes pulmonares y las células infiltrantes pulmonares en los ratones enfermos y los sanos.

A diferencia de lo que ocurre en el modelo de asma, en el modelo de colitis inducida por DDS la IL-17A y la IL-17F estaban considerablemente reguladas por incremento en los ratones enfermos, pero no en los ratones normales en el colon proximal y en el distal. Ninguna citocina estaba considerablemente regulada por aumento en los ganglios linfáticos mesentéricos. Además, se encontró que ambas citocinas estaban reguladas por aumento en el contexto de la colitis aguda inducida por DDS y no en la colitis crónica inducida por DDS.

En la dermatitis atópica no se detectaba el ARNm de la IL-17A. Se encontró que la IL-17F se expresaba en la piel y en los ganglios linfáticos drenantes de la piel, pero no parecía estar regulada significativamente por la enfermedad.

55 En la encefalomiелitis alérgica experimental, la IL-17A y la IL-17F parecían estar reguladas por aumento en la médula espinal en los ratones enfermos pero no en los ratones sanos. La IL-17F podría expresarse considerablemente más en los ganglios linfáticos en comparación con la médula espinal, pero la expresión en los

ganglios linfáticos no estaba regulada por la enfermedad. Sin embargo, el nivel global de la expresión en estos tejidos fue bastante bajo.

En pocas palabras, la expresión de la IL-17A y la IL-17F parece estar regulada por la enfermedad en el contexto de la colitis inducida por la DDS y en los modelos de encefalomiелitis alérgica experimental, pero aparentemente no en el asma ni en la dermatitis atópica.

Ejemplo 8

Construcción de vectores de expresión en *E. coli* para IL-17A y F humana

IL-17A

Construcción de pCHAN28

La construcción de expresión de IL-17A humana se generó del siguiente modo. La secuencia nativa de IL-17A se generó mediante amplificación por PCR con dos cebadores oligonucleótidos zc48.686 (SEC ID NO: 13) y zc48.685 (SEC ID NO: 14). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto; seguido por empapado a 4 °C. El fragmento de ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto. El sedimento se resuspendió en 10 µl de H₂O y se utilizó para la recombinación en el vector receptor cortado con SmaI, pTAP238, para producir las construcciones que codifican la IL-17A humana. Los clones resultantes se designados pCHAN28. Se digirieron con NotI (10 µl de ADN, 5 µl de tampón 3 New England Biolabs, 2 µl de Not I, 33 µl de H₂O durante 1 hora a 37 °C) y se volvió a ligar con tampón de ligasa de ADN de T4 (7 µl del digesto anterior, 2 µl de tampón 5X, 1 µl de ADN ligasa de T4). Esta etapa eliminó la secuencia de la levadura, el CEN-ARS, para agilizar el vector. Se digirieron alícuotas de ADN con Pvu2 y PstI para confirmar la ausencia de la secuencia de la levadura. Las construcciones de expresión de IL-17A humanos se transformaron en *E. coli*, cepa W3110. La secuencia de polinucleótidos para IL-17A humana se muestra en la SEC ID N° 5 y el correspondiente polipéptido de IL-17A codificado se muestra en la SEC ID N° 6.

IL-17F

Construcción de pTAP419

La construcción de expresión de IL-17F humana se generó del siguiente modo. La secuencia nativa de IL-17F se generó mediante amplificación por PCR con dos cebadores oligonucleótidos zc42.852 (SEC ID NO: 15) y zc42.854 (SEC ID NO: 16). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto; seguido por empapado a 4 °C. El fragmento de ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto. El sedimento se resuspendió en 10 µl de H₂O y se utilizó para la recombinación en el vector receptor cortado con SmaI, pTAP238, para producir las construcciones que codifican la IL-17F humana. Los clones resultantes se designados pTAP419. Se digirieron con NotI (10 µl de ADN, 5 µl de tampón 3 New England Biolabs, 2 µl de Not I, 33 µl de H₂O durante 1 hora a 37 °C) y se volvió a ligar con tampón de ligasa de ADN de T4 (7 µl del digesto anterior, 2 µl de tampón 5X, 1 µl de ADN ligasa de T4). Esta etapa eliminó la secuencia de la levadura, el CEN-ARS, para agilizar el vector. Se digirieron alícuotas de ADN con Pvu2 y PstI para confirmar la ausencia de la secuencia de la levadura. Las construcciones de expresión de IL-17F humanos se transformaron en *E. coli*, cepa W3110. La secuencia de polinucleótidos para IL-17F humana se muestra en la SEC ID N° 7 y el correspondiente polipéptido de IL-17F codificado se muestra en la SEC ID N° 8.

Ejemplo 9

Expresión de IL-17A en *E.coli*

Un plásmido de expresión que contiene pIL17A CH6 se construyó mediante recombinación homóloga usando la IL 17A CH6 y el vector de expresión pZMP20. El fragmento fue generado mediante amplificación por PCR usando los cebadores zc48895 (SEQ ID NO: 17) y zc48893 (SEC ID NO: 18). El fragmento de PCR IL17A CH6 contiene la región de codificación de IL17A fusionada a un marcador 6xHis en el extremo C, que se hizo usando IL17A humana como molde. El fragmento incluye un 'superposición con la secuencia del vector pZMP20, así como un 3' 5 solapamiento con el vector pZMP20 en el punto de inserción. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, seguido de 55°C, 1 minutos, seguido de 72 °C durante 3 minutos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. La mezcla de reacción de PCR se pasó por un gel de agarosa al 1% y una banda correspondiente al tamaño del inserto era se extrajo en gel usando un kit de extracción QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen, N° Cat. 28.704).

El plásmido pZMP20 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor CM V, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias de codificación, una secuencia de péptido señal oTPA (eliminado a través de recombinación en este caso); un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) elemento de puliovirus, y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C-terminal del dominio transmembrana; un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que comprende un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen DHFR, y el terminador

de SV40; y URA3 y CEN-ARS secuencias requeridas para la selección y replicación en *De S. cerevisiae*. El plásmido pZMP20 se cortó con BglIII (creando el punto de inserción) antes de la recombinación en la levadura con el fragmento de PCR. Cien microlitros de células de levadura competente (*S. cerevisiae*) se combinaron independientemente con 10 µl del ADN inserto y 100 ng de vector de corte pZMP20, y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se sometió a electropulsión utilizando la fuente de alimentación (BioRad Laboratories, Hercules, CA) ajustes de 0,75 kV (5 kV / cm), ∞ ohmios y 25 µF. A cada cubeta se añadieron 600 µl de sorbitol 1,2M añadido y la levadura se sembró en un alícuota de 100 µl y un alícuota de 300 µl sobre dos placas de URA-D y se incubaron a 30 °C. Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una única placa se resuspendieron en 1 ml de H₂O y se agitaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, tris 10 mM, a pH, EDTA 1 mM). Los 500 µl de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contiene 250 µl de perlas de vidrio de 600 µm lavadas con ácido y 300 µl de fenol-cloroformo, se agitaron durante 3 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos en una centrífuga de Eppendorf a velocidad máxima. Trescientos microlitros de la fase acuosa se transfirieron a un tubo nuevo, y el ADN se precipitó con 600 µl de etanol (EtOH), seguido por centrifugación durante 30 minutos a velocidad máxima. El tubo se decantó y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El tubo se decantó y el sedimento de ADN se resuspendió en 30 µl de TE.

La transformación de las células electrocompetentes de células huésped de *E. coli* (DH12S) se realizó con 5 µl de la preparación de ADN de levadura y 50 µl de células. Las células se sometieron a electropulsión a 2,0 kV, 25 µF y 400 ohmios. Tras la electroporación, se añadieron 1 ml de SOC (Bacto' Triptona al 2% (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5% (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y a continuación, las células se sembraron en un alícuota de 50 µl y de 200 µl en dos placas LB AMP (caldo LB (Lennox), 1,8% de Bacto™ Agar (Difco), 100 mg / l de ampicilina).

Los insertos de tres clones de la construcción se sometieron a análisis de secuencia y se seleccionó un clon para cada construcción, que contenía la secuencia correcta. Se aisló el ADN plásmido a mayor escala usando un kit comercialmente disponible (QIAGEN plásmido Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.

La expresión de pIL17A CH6 se logra a través de la transfección transitoria. Seis matraces de 1.000 ml se sembraron con 250 ml de células 293F en 1E6 c / ml y se apartaron. 20 ml de OptiMEM (Invitrogen, nº cat. 31985-070) se colocaron en cada uno de dos tubos cónicos de 50 ml. 2 ml de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat # 11668-019) se mezcló en una de los tubos cónicos de 50 ml con OptiMEM y 1,5 mg del plásmido de expresión IL17A CH6 pZMP20 se colocó en el otro tubo. Los tubos se invirtieron varias veces y se dejaron incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los dos tubos se mezclaron entre sí, se invirtieron varias veces, y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla de ADN-lipofectamina 2000 se distribuyó uniformemente en cada uno de los seis matraces mientras se agita los cultivos de células. Los matraces se colocaron en una incubadora sobre un agitador a 37 ° C, 6% de CO₂, y agitación a 120 RPM. Los cultivos se recogieron 96 horas más tarde.

Ejemplo 10

Expresión de IL-17F en *E.coli*

Un plásmido de expresión que contiene pIL17F CH6 se construyó mediante recombinación homóloga usando la IL17F CH6 y el vector de expresión pZMP20. El fragmento fue generado mediante amplificación por PCR usando los cebadores zc48894 (SEQ ID NO: 19) y zc48892 (SEC ID NO: 20). La IL17F CH6 humana contiene una región de codificación de IL17A fusionada a un marcador 6xHis en el extremo C, que se hizo usando un clon generado previamente de la IL17F humana como molde. El fragmento incluye un 'superposición con la secuencia del vector pZMP20, así como un 3' 5 solapamiento con el vector pZMP20 en el punto de inserción. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, seguido de 55°C, 1 minutos, seguido de 72 °C durante 3 minutos; 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. La mezcla de reacción de PCR se pasó por un gel de agarosa al 1% y una banda correspondiente al tamaño del inserto era se extrajo en gel usando un kit de extracción QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen, N° Cat. 28.704).

El plásmido pZMP20 es un vector de expresión de mamífero que contiene un casete de expresión que tiene el promotor CM V, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias de codificación, una secuencia de péptido señal oTPA (eliminado a través de recombinación en este caso); un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) elemento de puliovirus, y el dominio extracelular de CD8 truncado en el extremo C-terminal del dominio transmembrana; un origen de replicación de *E. coli*; una unidad de expresión de marcador seleccionable de mamífero que comprende un promotor de SV40, potenciador y origen de replicación, un gen DHFR, y el terminador de SV40; y URA3 y CEN-ARS secuencias requeridas para la selección y replicación en *De S. cerevisiae*.

El plásmido pZMP20 se cortó con BglIII (creando el punto de inserción) antes de la recombinación en la levadura con el fragmento de PCR. Cien microlitros de células de levadura competente (*S. cerevisiae*) se combinaron independientemente con 10 µl del ADN inserto y 100 ng de vector de corte pZMP20, y la mezcla se transfirió a una

5 cubeta de electroporación de 0,2 cm. La mezcla de levadura/ADN se sometió a electropulsión utilizando la fuente de alimentación (BioRad Laboratories, Hercules, CA) ajustes de 0,75 kV (5 kV / cm), ∞ ohmios y 25 μ F. A cada cubeta se añadieron 600 μ l de sorbitol 1,2 M añadido y la levadura se sembró en un alícuota de 100 μ l y un alícuota de 300 μ l sobre dos placas de URA-D y se incubaron a 30 °C. Después de aproximadamente 72 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una única placa se resuspendieron en 1 ml de H₂O y se agitaron brevemente para sedimentar las células de levadura. El sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2 %, SDS al 1 %, NaCl 100 mM, tris 10 mM, a pH, EDTA 1 mM). Los 500 μ l de la mezcla de lisis se añadieron a un tubo Eppendorf que contiene 250 μ l de perlas de vidrio de 600 μ m lavadas con ácido y 300 μ l de fenol-cloroformo, se agitaron durante 3 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos en una centrifuga de Eppendorf a velocidad máxima. Trescientos microlitros de la fase acuosa se transfirieron a un tubo nuevo, y el ADN se precipitó con 600 μ l de etanol (EtOH), seguido por centrifugación durante 30 minutos a velocidad máxima. El tubo se decantó y el sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70%.. El tubo se decantó y el sedimento de ADN se resuspendió en 30 μ l de TE.

15 La transformación de las células electrocompetentes de células huésped de *E. coli* (DH12S) se realizó con 5 μ l de la preparación de ADN de levadura y 50 μ l de células. Las células se sometieron a electropulsión a 2,0 kV, 25 μ F y 400 ohmios. Tras la electroporación, se añadieron 1 ml de SOC (Bacto' Triptona al 2% (Difco, Detroit, MI), extracto de levadura al 0,5% (Difco), NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) y a continuación, las células se sembraron en un alícuota de 50 μ l y de 200 μ l en dos placas LB AMP (caldo LB (Lennox), 1,8% de Bacto™ Agar (Difco), 100 mg / l de ampicilina).

20 Los insertos de tres clones de la construcción se sometieron a análisis de secuencia y se seleccionó un clon para cada construcción, que contenía la secuencia correcta. Se aisló el ADN plásmido a mayor escala usando un kit comercialmente disponible (QIAGEN plásmido Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.

25 La expresión de IL17F CH6 humana se logra a través de la transfección transitoria. Seis matraces de 1.000 ml se sembraron con 250 ml de células 293F en 1E6 c / ml y se apartaron. 20 ml de OptiMEM (Invitrogen, n° cat. 31985-070) se colocaron en cada uno de dos tubos cónicos de 50 ml. 2 ml de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Cat # 11668-019) se mezcló en una de los tubos cónicos de 50 ml con OptiMEM y 1,5 mg del plásmido de expresión IL17F CH6 pZMP20 se colocó en el otro tubo. Los tubos se invirtieron varias veces y se dejaron incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los dos tubos se mezclaron entre sí, se invirtieron varias veces, y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después, la mezcla de ADN-lipofectamina 2000 se distribuyó uniformemente en cada uno de los seis matraces mientras se agita los cultivos de células. Los matraces se colocaron en una incubadora sobre un agitador a 37 ° C, 6% de CO₂, y agitación a 120 RPM. Los cultivos se recogieron 96 horas más tarde.

Ejemplo 11

35 **Caracterización de los anticuerpos monoclonales que se unen a IL-17A y IL-17F**

Dos ensayos se realizan con los sobrenadantes que contienen el anticuerpo de los mejores clones de primera ronda en cada conjunto. En primer lugar, la concentración de IgG en cada sobrenadante usado en el ensayo de neutralización se determinó usando el kit de ELISA de IgG de ratón-(n° de catálogo 1 333 151 (Roche Applied Science). Esto permite activar una determinación de la actividad neutralizante específico para cada sobrenadante y, por tanto, hibridomas identificados que fueron produciendo los mAb anti-IL17A y la IL-17F e IL-17A más IL-17F neutralizantes más potentes. De este análisis se seleccionan los mAbs más potentes para una caracterización adicional. En segundo lugar, estudios de especificidad epítipo ("binning") preliminar se realizan con los sobrenadantes utilizando el instrumento de resonancia en plasmón superficial Biacore 1000.

Unión competitiva al epítipo

45 Se realizaron experimentos de especificidad epítipo y transferencia de Western para evaluar las características de unión funcionales de los anticuerpos monoclonales para IL-17A e IL-17F. Estos estudios se completan para determinar anticuerpos que se unen a diferentes epítopos, o determinantes antigénicos, en la IL-17A o IL-17F. Los anticuerpos monoclonales que se unen a la misma, o una parecida, epítipo en la IL-17A o IL-17F, respectivamente, no son capaces de unirse simultáneamente y están funcionalmente agrupados en una sola familia o "bin". Los anticuerpos monoclonales que se unen a diferentes epítopos en la IL-17A o IL-17F, son capaces de unirse simultáneamente y se agrupan en familias separadas o "bins". Los experimentos se realizaron usando un instrumento Biacore 1000™. Biacore es sólo uno de una variedad de formatos de ensayo que se utilizan de forma rutinaria paneles contenedores de epítopos de anticuerpos monoclonales. Muchas referencias (por ejemplo, El epítipo Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, volumen 6,6 Glenn E. Morris ed.) Describen procedimientos alternativos que pueden ser utilizados (por los expertos en la técnica) a "bin" los anticuerpos monoclonales, y se espera que proporcione información coherente relativa a las características de unión de los anticuerpos monoclonales para IL-17A e IL-17F. Los experimentos de agrupación de epítopos se realizan con IL-17A e IL-17F soluble, de antígeno nativo, derivado de *E. coli* derivadas de IL-17A e IL-17F recombinante de mamífero.

Transferencia de tipo western

La capacidad de los anticuerpos monoclonales a partir de los hibridomas para unir y detectar IL-17A and/or IL-17F desnaturalizadas y reducidas también se evalúa utilizando un formato de transferencia de Western.

Especificidad epítipo

5 A) Materiales y procedimientos

Los estudios de especificidad epítipo se realizaron en un sistema Biacore1000™ (Biacore, Uppsalla Suecia). Los procedimientos se programan utilizando el Procedimiento de Lenguaje de definición (MDL) y de ejecución mediante el software de control Biacore, v 1.2. El anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón de Fc de IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) se inmoviliza covalentemente a un chip sensor CM5 Biacore y se utiliza para unir (captura) el anticuerpo monoclonal primario de la serie de prueba para el chip. Los sitios de unión de Fc desocupados en el chip se bloquean utilizando un fragmento Fc de IgG policlonal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Posteriormente, la IL-17A o IL-17F se inyecta y se dejaron unirse específicamente al anticuerpo monoclonal primario capturado. El instrumento Biacore mide la masa de proteína unida a la superficie del chip sensor, y por lo tanto, la unión de tanto el anticuerpo primario como el antígeno IL-17A o la IL-17F, se verifican para cada ciclo. Después de la unión del anticuerpo primario y el antígeno para el chip, un anticuerpo monoclonal de la serie de ensayos se inyecta como el anticuerpo secundario, y deja que se una al antígeno de pre-unión. Si el anticuerpo monoclonal secundario es capaz de unirse al antígeno de IL-17A o IL-17F simultáneamente con el anticuerpo monoclonal primario, un aumento de masa en la superficie del chip, o de unión, se detecta. Si el anticuerpo monoclonal secundario es capaz de unirse al antígeno de IL-17A o IL-17F simultáneamente con el anticuerpo monoclonal primario, no se detecta masa adicional ni unión. Cada anticuerpo monoclonal se prueba contra sí mismo y se utiliza como control negativo para establecer el nivel de la señal de fondo (sin unión).

Cada anticuerpo monoclonal purificado se prueba como el anticuerpo primario en combinación con todo el panel de anticuerpos monoclonales seleccionados. Todos los anticuerpos monoclonales purificados se ensayaron a concentraciones iguales. Entre los ciclos, el anticuerpo de cabra anti-ratón IgG Fc de anticuerpo de captura en el chip se regeneró con HCl 20 mM. Ciclos de control se ejecutan para demostrar la falta de respuesta del anticuerpo secundario en la ausencia de anticuerpo primario o antígeno. Los datos se recopilan utilizando BioEvaluation 3.2 software de RCI, y luego se cargan en Excel™ para el procesamiento de datos.

B) Transferencia de tipo western

La capacidad de los anticuerpos monoclonales a partir de cada clon para detectar IL-17A o IL-17F reducidas/desnaturalizadas también se evalúa utilizando un formato de transferencia de Western. Un anticuerpo policlonal de conejo conocido para detectar la IL-17A y / o IL-17F en un formato de transferencia de Western se utiliza como control positivo.

Materiales y procedimientos

El antígeno de IL-17A e IL-17F se obtiene a partir de dos fuentes: la IL-17A e IL-17F es ya sea producida en E. coli o en células de mamífero tales como células 293 (como se describe en el presente documento) y se purificó. Alícuotas de cada antígeno (100 ng / carril) se cargan en 4-12% de geles de NuPAGE Bis-Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA) en tampón de muestra no reductor o reductor (Invitrogen) junto con patrones de peso molecular (SeeBlue; Invitrogen) y la electroforesis se llevó a cabo en MES 1x tampón de ejecución (Invitrogen). Después de la electroforesis, la proteína se transfirió desde el gel a 0,2 micrómetros membranas de nitrocelulosa (Invitrogen). Las transferencias de nitrocelulosa se bloquean durante la noche en 2,5% sin grasa leche en polvo en tampón Western A (ZymoGenetics, Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, 0,05% de Igepal, 0,25% de gelatina) luego se corta en secciones y expuestos a cada anticuerpo (0,2 µg / ml de cada anticuerpo monoclonal o 0,5 µg / ml del anticuerpo policlonal de conejo en tampón Western A. Las transferencias se sondan continuación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante; de oveja anti-IgG de ratón-HRP (Amersham: Piscataway, NJ) para los anticuerpos monoclonales e Ig-HRP de burro anti-conejo (Amersham) para los anticuerpos policlonales. Se detecta el anticuerpo unido usando un reactivo quimioluminiscente (Lumi-Light Plus reactivo: Roche, Mannheim, Alemania) y las imágenes de las manchas están grabados en un Lumi-Imager (Mannheim-Boehringer) o película de rayos X.

Ejemplo 12**Purificación de la proteína IL17A marcada con His en el extremo C del Sistema Celular Transitorio 293**50 IL-17A murina

Los medios liberados se ajustaron a 25 mM de imidazol, 500 mM de NaCl pH 7,5, mediante la adición de sólido (Fluka y JT Baker, respectivamente) (volumen total 1,41l). La expresión de su diana marcada con His a través de western blot mediante RP-HPLC (1,11mg /). Los medios ajustados se cargaron en una columna Ni NTA Su Bind Superflow (Novagen) (5 ml, diámetro de 1 cm, Millipore) durante la noche a 4 ° C. El flujo continuo se comprobó mediante RP-HPLC y transferencia Western blot que carecía de IL17A diana. La columna de Ni NTA se lavó con

NaPO₄ 50 mM, imidazol 25 mM, NaCl 0,5 M a pH 7,5 hasta que se estabilizó la A280nm UV basal. La columna eluyó en dos etapas: tampón que antes se ajustó a 45 mM y 500 mM de imidazol utilizando la reserva. Las fracciones de elución verificaron por análisis de tinción de plata, con los que contienen el conjunto diana(500 mM etapa de elución). El conjunto de de Ni NTA se analizó mediante RP-HPLC. El conjunto de Ni NTA se concentró hasta 2 ml contra la membrana 10 kD MWCO Ultracel (Millipore) y se inyectó sobre columna Superdex ® 75 (GE Healthcare, 12/60mm) en NaPO₄ 50 mM, NaCl 109 mM, pH 7,3 a 1.02 ml/min .Dos picos se resolvieron y se analizaron mediante tinción de plata. La IL17A murina se resolvió muy bien de las proteínas contaminantes restantes. Las fracciones que contenían el conjunto diana se concentraron de nuevo hasta 2,0 ml utilizando membrana de MWCO de 10 kDa Ultracel (Millipore), se filtraron con un filtro de 0,22 um y se alicuotaron,

10 IL-17A humana

Los medios liberados se ajustaron a 25 mM de imidazol, 500 mM de NaCl pH 7,5, mediante la adición de sólido (Fluka y JT Baker, respectivamente) (volumen total 1,41l). La expresión de su diana marcada con His a través de western blot usando A1022G como patrón y también mediante RP-HPLC (3,19 mg / l). Los medios ajustados se cargaron en una columna Ni NTA Su Bind Superflow (Novagen) (5 ml, diámetro de 1 cm, Millipore) durante la noche a 4 ° C. El flujo continuo se comprobó mediante RP-HPLC y transferencia Western blot que carecía de IL17A diana. La columna de Ni NTA se lavó con NaPO₄ 50 mM, imidazol 25 mM, NaCl 0,5 M a pH 7,5 hasta que se estabilizó la A280nm UV basal. La columna eluyó en dos etapas: tampón que antes se ajustó a 45 mM y 500 mM de imidazol utilizando la reserva. Las fracciones de elución verificaron por análisis de tinción de plata, con los que contienen el conjunto diana(500 mM etapa de elución). El conjunto de de Ni NTA se analizó mediante RP-HPLC usando A1022F como patrón. El conjunto de Ni NTA se concentró hasta 5 ml contra la membrana 10 kD MWCO Ultracel (Millipore) y se inyectó sobre columna Superdex ® 75 (GE Healthcare, 26/60mm) en NaPO₄ 50 mM, NaCl 109 mM, pH 7,3 a 2,71 ml/min .Dos picos se resolvieron y se analizaron mediante tinción de plata. La IL17A murina se resolvió muy bien de las proteínas contaminantes restantes. Las fracciones que contenían el conjunto diana se concentraron de nuevo hasta 9,0 ml utilizando membrana de MWCO de 10 kDa Ultracel (Millipore), se filtraron con un filtro de 0,22 um y se alicuotaron,

Ejemplo 13

Purificación de la proteína IL17F marcada con His en el extremo C del Sistema Celular Transitorio 293

Medios IMAC de captura de afinidad en 293F de expresión transitoria. Los medios se ajustaron a imidazol 25 mM; NaPhos 25 mM; NaCl 400 mM y pH 7,5. Por lo tanto los medios de comunicación ajustada se cargaron a 1ml/min sobre un lecho de 5 ml de Qiagen NTA Superflow (1 cm de diámetro) equilibrada en NaPhos 25 mM ; imidazol 25 mM;NaCl 500 mM a pH 7,5. Al completar la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio antes de 20CV eluyendo con un gradiente de 10 CV de tampón de elución formado entre y NaPhos 25 mM ; imidazol 500 mM; NaCl 500 mM a pH 7,5. Las fracciones se analizaron por RP-HPLC para el producto, reunieron y se concentraron para la etapa SEC. El conjunto concentrado de la etapa de IMAC se inyectó en una columna Pharmacia Superdex 75 SEC equilibrada en NaPhos 50 mM; NaCl 109 mM de a pH 7,2.Un pico simétrico principal que eluyó a ~ 0,5 CV contiene el producto. Las muestras se agruparon y se filtraron de forma estéril a 0,2 micrómetros en preparación para la división en alícuotas.

Ejemplo 14

Eficacia de un anticuerpo que se une tanto a IL-17A como a IL-17F en muestras de EII humana a través de la función de barrera epitelial

El mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial es un factor decisivo para que el tubo digestivo se conserve sano. Las pruebas experimentales sugieren que las fugas a través de la barrera epitelial del intestino podrían contribuir al desarrollo de las enteropatías inflamatorias. Las células inmunitarias ubicadas en la lámina propia intestinal interactúan generalmente con las células epiteliales intestinales a través del contacto intercelular o la síntesis de factores solubles para mantener la supervivencia inmunitaria y contribuir a la integridad de la barrera epitelial. Sin embargo, la inflamación con mediación inmunitaria prolongada o desregulada puede contribuir a provocar deficiencias en la integridad y la función de las células de la barrera epitelial. El siguiente estudio está diseñado para medir el o los efectos directos sobre la integridad de la barrera epitelial que ejercen la IL-17A y/o la IL-17F sintetizadas por los linfocitos T.

En este ejemplo, las estirpes de las células epiteliales intestinales, como las células Caco-2, se diferencian en membranas semipermeables y se co cultivan en el lado basolateral con linfocitos T o con monocitos derivados de biopsias de pacientes con una enteropatía inflamatoria o de individuos normales. La integridad de la monocapa epitelial se vigila en el tiempo utilizando la evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial o la resistencia que pone la monocapa a la difusión del colorante. Las disminuciones en la resistencia transepitelial de las monocapas en los cocultivos sugeriría una alteración en la monocapa inducida por la actividad de los linfocitos T o los monocitos en el cocultivo. Los inhibidores de la IL-17A y la IL-17F tal como los anticuerpos de la presente invención, se podrían utilizar para determinar la contribución relativa de la IL-17A y de la IL-17F a la alteración de la monocapa epitelial y analizar si los inhibidores de las IL-17A e IL-17F serían eficaces a la hora de mantener la integridad de la barrera

epitelial. La prevención de la alteración de la monocapa epitelial inducida por los linfocitos T activados mediante tales moléculas sugeriría que los anticuerpos de la presente invención serían eficaces para el tratamiento terapéutico de las EII en los humanos.

- 5 También se podrían generar los sistemas de cocultivo utilizando monocapas formadas por el epitelio primario de pacientes con enteropatía inflamatoria para determinar si estas células son más sensibles a la IL-17A y a la IL-17F en comparación con las células epiteliales obtenidas de individuos sanos. Si es así, estos datos sugerirían que inhibir la IL-17A y la IL-17F sería una estrategia adecuada para el tratamiento terapéutico de las EII.

Ejemplo 15

10 **Efectos de la IL-17A y la IL-17F sobre los linfocitos T y los monocitos/macrófagos de la lámina propia de muestras humanas normales y de EII**

15 La inflamación con mediación inmunitaria prolongada o con alteración de la regulación puede contribuir a los síntomas o a la enfermedad asociada a las enteropatías inflamatorias a través de daños al tejido o a la asimetría permanente de las respuestas inmunitarias prolongadas o inadecuadas. Este modelo puede determinar las posibles consecuencias posteriores de que los linfocitos T y los monocitos asociados a la enfermedad se expongan a la IL-17A y a la IL-17F, que pueden estar presentes en el medio de citocinas del entorno inmediato del tejido intestinal.

Los medicamentos que serían eficaces contra las enteropatías inflamatorias humanas in vivo funcionarían en los modelos ex vivo anteriores al inhibir y/o neutralizar la producción y/o presencia de mediadores inflamatorios (incluidos, pero sin limitarse a ellos, IL-1b, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17A y F, IL-18, IL-23, TNF-a, IFN-g, miembros de la familia MIP, MCP-1, G-F y GM-CSF, etc.).

20 En este modelo se aíslan los linfocitos T y los monocitos/macrófagos a partir de muestras de biopsia cortando cuidadosamente con una tijera trozos en HBSS, tratándolos con colagenasa y dispasa II e incubándolos durante 1 hora a 37°C en un agitador. Se filtra la suspensión celular a través de una malla de nylon para retirar los desechos y los agregados celulares y se lavan varias veces en HBSS. Se pueden aislar los linfocitos T y los macrófagos/monocitos mediante la clasificación directa de las células o mediante protocolos de enriquecimiento/agotamiento de perlas. Se incuban las células aisladas en presencia de la IL-17A y de la IL-17F. Esto induce la producción de los mediadores inflamatorios desde los linfocitos T y los monocitos/macrófagos o da lugar a la asimetría de las respuestas posteriores de los linfocitos T a respuestas altamente proinflamatorias. Las comparaciones entre los tipos de mediadores inflamatorios producidos por las células de pacientes con enteropatías inflamatorias y los de las células de individuos normales, y se podría sugerir que los linfocitos T y los monocitos/macrófagos de los pacientes con enteropatías inflamatorias producen un perfil más proinflamatorio en presencia de IL-17A y de IL-17F. La adición de anticuerpos de la presente invención para neutralizar la producción posterior de los mediadores inflamatorios inducidos por la IL-17A y la IL17F sugiere que los anticuerpos pueden ser eficaces para el tratamiento terapéutico de los pacientes con EII.

Ejemplo 16

35 **Eficacia de los anticuerpos que se unen a IL-17A y a IL-17F en síndrome del intestino irritable (SII): patología dirigida por el SNC**

40 Un modelo que se centra en la patología del SII dirigida por el SNC que utiliza estímulos de estrés para inducir los síntomas característicos del SII. El modelo de estrés psicosocial neonatal imita algunas características clínicas asociadas a los pacientes que padecen SII, incluidas la hiperalgesia, la diarrea y la sensibilidad al estrés. La separación de la cría de su madre todos los días durante 180 minutos entre los días 4 a 18 después del nacimiento dará lugar a la alteración del comportamiento materno y reducirá significativamente las veces que se manifiesta el comportamiento de cuidado o aseo. El estrés de los recién nacidos da lugar a cambios permanentes en el SNC que da lugar a una alteración de la sensibilidad al dolor somático y visceral inducido por el estrés. La función motora colónica en respuesta al estrés mejora en estos animales y los datos preliminares muestran indicios de un aumento de la permeabilidad intestinal (Mayer y col., 2002). El tratamiento con un polipéptido soluble de la presente invención, tal como un polipéptido IL-17RC soluble o un polipéptido IL17RC/IL-17RA soluble (SEQ ID n.º 158) y el análisis posterior de la función motora colónica, de la permeabilidad epitelial y de la respuesta a estímulos de estrés podría determinar la eficacia en este modelo animal de SII. La disminución de la incidencia de los síntomas después del tratamiento con estos inhibidores sugeriría la posible eficacia del tratamiento del SII.

50 **Ejemplo 17**

Eficacia de los anticuerpos que se unen a IL-17A y a IL-17F en muestras de síndrome del intestino irritable (SII): inductores del estrés dirigidos principalmente al intestino

55 Se trata de un modelo que se centra en los inductores del estrés dirigidos principalmente al intestino (a saber, inflamación del intestino, infección o estrés físico). Los estudios en animales han indicado que la inflamación leve o la activación inmunitaria puede ser una base para que se altere la motilidad y/o la función aferente y epitelial del intestino (Mayer y col., 2002). En este modelo se produce la irritación diaria del colon en los animales recién nacidos

(días 8 a 21) en forma de inyección intracolónica diaria de aceite de mostaza. El aceite de mostaza es un estimulador neural y se ha demostrado que induce la hiperalgesia visceral después de la administración intracolónica. Este modelo imita las características clave del SII incluidas la hipersensibilidad visceral y la alteración de los hábitos intestinales. Los animales también presentan diarrea y estreñimiento, una característica clave de los pacientes con SII (Mayer y col., 2002; Kimball y col., 2005). Se podría administrar un anticuerpo de la presente invención para determinar los cambios en la aparición de los síntomas asociados a este modelo. La disminución de la incidencia o la magnitud de la hipersensibilidad visceral y la alteración de la movilidad del intestino después del tratamiento terapéutico con nuestros inhibidores sugeriría que es posible que estas moléculas resulten eficaces para el tratamiento del SII.

10 Ejemplo 18

Generación de los anticuerpos IL-17A / F

A) Ensayo de captura

La capacidad de los anticuerpos anti-IL-17A o anti-IL-17F humana o en los antisueros para unirse a la IL-17F y / o IL-17A se evaluó usando un ensayo de ELISA de captura. En este ensayo, las placas de 96 pocillos de ELISA de poliestireno se recubrieron primero con 100 μ l / pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, anticuerpo específico de Fc (Jackson ImmunoResearch) a una concentración de 1000 ng / ml en tampón de revestimiento (0,1 M de Na_2CO_3 , pH 9,6). Se preparó una placa para cada ligando. Las placas se incubaron durante la noche a 4 ° C después de lo cual el anticuerpo no unido se aspiró y las placas se lavó dos veces con 300 μ l / pocillo de tampón de lavado (PBS-Tween definido como NaCl 0,137M, KCl 0,0027M, Na_2HPO_4 0,0072M, KH_2CO_4 0,0015M, 0,05% v / v de polisorbato 20, pH 7,2). Los pocillos se bloquearon con 200 μ l / pocillo de tampón de bloqueo (PBS-Tween, más 1% w / v de albúmina de suero bovino (BSA)) durante 1 hora, después de lo cual las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado. Se prepararon diluciones en serie por 10 (en tampón de bloqueo) de los sueros comenzando con una dilución inicial de 1:1000 y se extendieron a 1:1.000.000. Las muestras duplicadas de cada dilución se transfirieron después a la placa de ensayo, 100 μ l / pocillo, con el fin de unir la IgG de ratón en el suero a la placa de ensayo a través de la porción Fc de la molécula. Los sueros de ratones normales sirvieron como control negativo, se añadió proteína IL7RC-Fc humana como un control positivo del ensayo. NOTA: El revestimiento para este control fue de IgG anti-humana de cabra, anticuerpo específico de Fc (Jackson ImmunoResearch). Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y las placas se lavaron dos veces como se describió anteriormente. IL17F Biotinilada (proporción molar 6:01 de biotina: proteína) o IL17F biotinilada (proporción molar 10:1 de biotina: proteína) a concentraciones de 500 ng / ml se añadieron después a los pocillos (placas separadas), 100 μ l / pocillo. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, el ligando biotinilado no unido se aspiró de los pocillos y las placas se lavaron dos veces. Después, a cada pocillo se añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (Pierce, Rockford, IL) a una concentración de 500 ng / ml, 100 μ l / pocillo, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la eliminación del HRP-SA no unido, las placas se lavaron 2 veces, a cada pocillo se añadieron 100 μ l / pocillo de tetra metil bencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y las placas se incubaron durante 2 minutos a TA. El desarrollo de color se detuvo mediante la adición de 100 μ l / pocillo de reactivo de detención TMB 450 nm (BioFX laboratorios, Owings Mills, MD) y los valores de absorbancia de los pocillos se leyeron en un instrumento Molecular Devices Spectra MAX 340 a 450 nm.

40 B) Ensayo directo

La capacidad de los anticuerpos anti-IL-17A o anti-IL-17F humana o en los antisueros para unirse a la IL-17F y / o IL-17A se evaluó usando un ensayo de ELISA directo. En este ensayo, las placas de 96 pocillos de ELISA de poliestireno se recubrieron primero con 100 μ l / pocillo de IL-17F or IL-17A a concentraciones de 1000 ng / ml en tampón de revestimiento (0,1 M de Na_2CO_3 , pH 9,6). Se preparó una placa para cada ligando. Las placas se incubaron durante la noche a 4 ° C después de lo cual la proteína no unida se aspiró y las placas se lavó dos veces con 300 μ l / pocillo de tampón de lavado (PBS-Tween definido como NaCl 0,137M, KCl 0,0027M, Na_2HPO_4 0,0072M, KH_2CO_4 0,0015M, 0,05% v / v de polisorbato 20, pH 7,2). Los pocillos se bloquearon con 200 μ l / pocillo de tampón de bloqueo (PBS-Tween, más 1% w / v de albúmina de suero bovino (BSA)) durante 1 hora, después de lo cual las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado. Se prepararon diluciones en serie por 10 (en tampón de bloqueo) de los sueros comenzando con una dilución inicial de 1:1000 y se extendieron a 1:1.000.000. Las muestras duplicadas de cada dilución se transfirieron después a la placa de ensayo, 100 μ l / pocillo, con el fin de unir la proteína específica en el suero a la placa de ensayo. Los sueros de ratones normales sirvieron como control negativo, zcytor14 (lot A1034F) se añadió proteína IL7RC-Fc humana como un control positivo del ensayo. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y las placas se lavaron dos veces como se describió anteriormente. Después, a los pocillos de ambas placas se añadió IgG anti-ratón de cabra marcada con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch) a una concentración de 1:5000, 100 μ l / pocillo. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, el anticuerpo no unido se aspiró de los pocillos y las placas se lavaron dos veces. A cada pocillo se añadieron 100 μ l / pocillo de tetra metil bencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) a y las placas se incubaron durante 2 minutos a RT. El desarrollo de color se detuvo mediante la adición de 100 μ l / pocillo de reactivo de detención TMB 450 nm (BioFX laboratorios, Owings Mills, MD) y los valores de absorbancia de los pocillos se leyeron en un instrumento Molecular Devices Spectra MAX 340 a 450

nm.

C) Ensayo de neutralización

La capacidad de los anticuerpos anti-IL-17A o anti-IL-17F humana o en los antisueros para inhibir (neutralizar) la actividad estimuladora de IL-17F y / o IL-17A a través de su receptor afín se evaluó usando un ensayo de neutralización en placa. En este ensayo, las placas de 96 pocillos de ELISA de poliestireno se recubrieron primero con 100 μ l / pocillo de proteína IL17RC-Fc IL a una concentración de 1000 ng / ml en tampón de revestimiento (0,1 M de Na_2CO_3 , pH 9,6). Se preparó una placa para cada ligando. Las placas se incubaron durante la noche a 4 ° C después de lo cual el receptor no unido se aspiró y las placas se lavó dos veces con 300 μ l / pocillo de tampón de lavado (PBS-Tween definido como NaCl 0,137M, KCl 0,0027M, Na_2HPO_4 0.0072M, KH_2CO_4 0,0015M, 0,05% v / v de polisorbato 20, pH 7,2). Los pocillos se bloquearon con 200 μ l / pocillo de tampón de bloqueo (PBS-Tween, más 1% w / v de albúmina de suero bovino (BSA)) durante 1 hora, después de lo cual las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado. Se realizaron diluciones en serie por 10 (en tampón de bloqueo) de los sueros comenzando con una dilución inicial de 1:500 y oscilaron a 1:500.000. Biotinilado IL-17F (proporción molar 6:01 de biotina: proteína) o IL17A biotinilada (proporción molar 10:1 de biotina: proteína) a una concentración de 200 ng / ml se añadieron después a los pocillos de las placas de dilución (placas separadas), 100 μ l / pocillo, se mezcló bien pipeteando arriba y abajo varias veces y se incubaron 1 hora a TA. NOTA: La mezcla de las diluciones de suero y los ligandos biotinilados en volúmenes iguales resultados en la serie de dilución 1:1000 convertirse a través de 1:1.000.000 y las concentraciones de ligando convertirse en 100 ng / ml. Las muestras duplicadas de cada solución de ligando sueros de dilución / biotinilado se transfirieron entonces a la placa de ensayo, 100 μ l / pocillo. Los sueros de ratones normales sirvieron como control negativo, se añadió proteína IL-17RC-Fc humana como un control positivo del ensayo. Después de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y las placas se lavaron dos veces como se describió anteriormente. Después, a cada pocillo se añadió estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (Pierce, Rockford, IL) a una concentración de 500 ng / ml, 100 μ l / pocillo, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la eliminación del HRP-SA no unido, las placas se lavaron 2 veces, a cada pocillo se añadieron 100 μ l / pocillo de tetra metil bencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) a y las placas se incubaron durante 3 minutos a RT. El desarrollo de color se detuvo mediante la adición de 100 μ l / pocillo de reactivo de detención TMB 450 nm (BioFX laboratorios, Owings Mills, MD) y los valores de absorbancia de los pocillos se leyeron en un instrumento Molecular Devices Spectra MAX 340 a 450 nm.

D) Esquema de inmunización

Se inmunizaron cinco ratones hembra balb/C con IL-17F-BSA (50 μ g cada una) cada dos semanas durante 6 semanas (3 inmunizaciones) mediante inyección interperitoneal. Dos semanas más tarde, estos ratones fueron reforzados con IL17A-BSA (50 μ g cada una) a través de la inyección interperitoneal. Se extrajo sangre cada semana después de los últimos 3 refuerzos para la evaluación de los sueros. Aproximadamente dos meses después del último refuerzo, los 5 animales se reforzaron con IL-17A-BSA (50 μ g cada una) a través de la inyección subcutánea y se extrajo una última muestra para la evaluación de los sueros.

E) Conclusión de la evaluación sérica mediante ELISA

Tanto el ensayo de ELISA de captura, así como el ensayo de ELISA directo indican que los cinco ratones desarrollaron una respuesta de anticuerpos significativa a la IL-17F. El ensayo directo indica que cuatro de los cinco ratones también se une moderadamente la IL-17A y un ratón débilmente se une a IL-17A. El ensayo de neutralización indica que dos de los cinco ratones inhiben moderadamente la unión de la IL-17F y otros dos inhiben débilmente inhibir la unión de la IL-17F. Un ratón no inhibe la unión de la IL-17F en absoluto. También se indica por este ensayo es que dos de los cinco ratones inhiben débilmente la unión de la IL-17A, mientras que los otros tres no inhiben la unión. ratón inhibe la unión de ambos ligandos a diferentes grados.

F) Procedimiento de Fusión

Después de un mínimo de cuatro semanas después de la inmunización final, el ratón con el título de neutralización de IL-17F e IL-17A más significativo se inmunizó un tiempo final con aproximadamente 50 μ g de IL-17A-BSA en PBS a través de inyección subcutánea. En condiciones normales, cinco días después de la extracción del bazo y los ganglios linfáticos de este ratón, se preparó en una suspensión de células individuales y se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón Ag8 en una célula linfocitoide 2:1. célula de mieloma con PEG 1500 usando el protocolo interno estándar. En este ejemplo, el ratón murió después de la inyección y se extrajo el bazo, preparado en una única suspensión de células y se congeló a -80 ° C durante 5 días. Después de descongelar rápidamente la suspensión de células del bazo, se completó la fusión como se ha indicado anteriormente. La mezcla de fusión se distribuye en una serie de placas de 96 pocillos de fondo plano. Los pocillos de las placas de fusión fueron alimentados a los 4-7 días (mínimo de dos veces, máximo de 3 veces). Los pocillos se ensayaron ocho días después de galvanoplastia de la fusión.

G) Detección selectiva de la fusión

El ELISA de captura y neutralización de ELISA para IL-17F e IL-17A como se describe anteriormente se utilizaron para la detección selectiva, salvo que los sobrenadantes de los hibridomas se ensayaron sin diluir de las placas de

cultivo. Todos los clones positivos '(descritos en detalle en el Ejemplo 19) se verificaron mediante la repetición de los dos ensayos con las muestras en duplicado. Todos los clones "positivos" se ampliaron en la cultura, en placas de 24 pocillos. Cuando la densidad de los cultivos de 24 pocillos fue de aproximadamente $4-6 \times 10^6$ células / ml, los sobrenadantes (aproximadamente 1,8 ml) se recogieron y se almacenaron para cada clon y las células de cada pocillo criopreservado individualmente. Los sobrenadantes recogidos se utilizaron para evaluar aún más que los clones de satisfacer las necesidades de reactivos solicitados. Los clones apropiados se sometieron a 1^{er} y 2^a ronda de clonación previa de ampliar para la purificación

Los hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales frente a IL-17A e IL-17F se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Manassas VA) de depósito de la patente como depósitos originales en virtud del Tratado de Budapest y se les dio los siguientes n° de acceso: clon 339,15,5.3 (Designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7987, depositada el 7 de noviembre de 2006); clon 339,15,3.6 (Designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7988, depositada el 7 de noviembre de 2006); y clon 339,15,6.16 (Designación en el depósito de patentes de la ATCC PTA-7989, depositada el 7 de noviembre de 2006).

Ejemplo 19

Protocolo del ensayo de unión competitiva IL-17A/F mAb

Para evaluar la capacidad de anticuerpos IL-17A/F de la presente invención (como se divulga en el ejemplo 18) para unirse a los ligandos IL-17A e IL-17F, se utilizó un ensayo de unión competitivo basado en citometría de flujo. La incubación de una estirpe de células BHK transfectada establemente con el IL-17RC completo en presencia de los ligandos IL-17A o IL-17F, y el anticuerpo IL-17A/F de la presente invención dirigido a unirse selectivamente a los ligandos permite detectar el ligando unido a la superficie celular (y por lo tanto, sin unir al anticuerpo). La biotilación del ligando permite detectarlo por FACS mediante un fluoróforo secundario conjugado a estreptavidina. Una reducción del ligando unido a la célula sobre una valoración del receptor soluble se registra como una reducción de la fluorescencia media de las células.

Los ligandos biotilados se mezclan de antemano por separado a 1 ug/ml con cantidades valorables del receptor soluble en medio de tinción (HBSS + SAB al 1% + NaAzida al 0,1% + HEPES a 10 mM) en volúmenes de 100 ul y se incuban a TA durante 15 minutos. Se prepara una estirpe de células BHK transfectada establemente con el IL17RC completo para teñir el ligando mediante la resuspensión con Versene (Invitrogen, n.º de catálogo 15040 - 066), el equilibrado a 2×10^5 células/100 ul, la sedimentación y la resuspensión en la premezcla ligando/anticuerpo. Se incuban las células teñidas a 4°C durante 30 minutos, se lavan 1x en medio de tinción y se tiñen con estreptavidina-PE (BD Pharmingen, n.º de catálogo 554061) en una proporción 1:100. Se incuban las células a 4°C en la oscuridad durante 30 minutos, se lavan 2x en medio de tinción y se resuspenden en medio de tinción y Cytotfix® (BD Bioscience 554655). Se utiliza un citómetro de flujo LSRII de BD o un instrumento similar para recoger los datos y realizar el análisis. La figura describe un gráfico estándar. Se genera el gráfico utilizando el del protocolo. Se genera el gráfico utilizando el programa informático Prizm. Los valores en Y representan la IMF normalizada por el máximo y el mínimo (100% y 0%) en base únicamente al ligando y no a los pocillos de control que contienen solo el ligando y sin ligando ni receptor soluble y, por lo tanto, el porcentaje de unión del ligando a las células. El programa informático calcula la IC_{50} de cada curva

La Tabla 1 contiene los valores de IC_{50} obtenidos para cada anticuerpo de IL-17A / F.

Tabla 1

Clon	Reactividad	Unión competitiva de IC_{50} (ug/ml)	
		IL17A	IL17F
339,15,3.6	IL17A & F	38,0	3,5
339,15,5.3	IL17A & F	35,0	3,6
339,15,6.16	IL17A & F	28,0	3,5

A partir de lo anterior se apreciará que, aunque en el presente documento se han descrito realizaciones de la invención a efectos ilustrativos, se pueden realizar varias modificaciones sin desviarse del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ZymoGenetics, Inc.

Jaspers, Stephen R.

Presnell, Scott R.

Rixon, Mark W.

Levin, Steven D.

5 Huber, Monica

<120> Anticuerpos que se unen a IL-17A y a IL-17f y procedimientos de uso de los mismos

<130> 07 - 11PC

10

<160> 20

<170> FastSEQ para Windows Versión 4,0

15 <210> 1

<211> 1874

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

ES 2 463 482 T3

```

gaattccggc aggcacaaac tcattccatcc ccagttgatt ggaagaaaca acgatgactc 60
ctgggaagac ctcatgggtg tcaactgctac tgctgctgag cctggaggcc atagtgaagg 120
caggaatcac aatcccacga aatccaggat gcccaaattc tgaggacaag aacttcccc 180
ggactgtgat ggtcaacctg aacatccata accggaatac caataccaat cccaaaaggt 240
cctcagatta ctacaaccga tccacctcac cttggaatct ccaccgcaat gaggaccctg 300
agagatatcc ctctgtgac tgggaggcaa agtgccgcca cttgggctgc atcaacgctg 360
atgggaacgt ggactaccac atgaactctg tccccatcca gcaagagatc ctggtcctgc 420
gcaggagacc tccacactgc cccaactcct tccggctgga gaagatactg gtgtccgtgg 480
gctgcacctg tgtcaccctg attgtccacc atgtggccta agagctctgg ggagcccaca 540
ctccccaaag cagttagact atggagagcc gaccagccc ctcaggaacc ctcatccttc 600
aaagacagcc tcatttcgga ctaaaactcat tagagtctt aaggcagttt gtccaattaa 660
agcttcagag gtaacacttg gccaaagatat gagatctgaa ttaccttcc ctctttccaa 720
gaaggaaggt ttgactgagt accaatttgc ttcttgttta cttttttaag ggctttaagt 780
tatttatgta tttaatatgc cctgagataa ctttgggta taagattcca ttttaatagaa 840
ttacctactt tattttgttt gtctttttaa agaagataag attctgggct tgggaatttt 900
attattttaa aggtaaaacc tgtatttatt tgagctattt aaggatctat ttatgtttaa 960
gtatttagaa aaagtgaaa aagcactatt atcagttctg cctaggtaaa tgtaagatag 1020
aattaaatgg cagtgcacaaa tttctgagtc tttacaacat acggatatag tatttcctcc 1080
tctttgtttt taaaagttat aacatggctg aaaagaaaga ttaaacctac ttcatatgt 1140
attaatttaa attttgcaat ttgttgaggt tttacaagag atacagcaag tctaactctc 1200
tgttccatta aacccttata ataaaatcct tctgtaataa taaagtttca aaagaaatg 1260
tttatttggt ctcatataat gtattttagc aaactcagct cttccctatt gggaagagtt 1320
atgcaaattc tcctataagc aaaacaaagc atgtcttga gtaacaatga cctggaaata 1380
cccaaaattc caagttctcg atttcacatg cttcaagac tgaacaccga ctaaggtttt 1440
catactatta gccaatgctg tagacagaag cattttgata ggaatagagc aaataagata 1500
atggccctga ggaatggcat gtcattatta aagatcatat ggggaaatg aaaccctccc 1560
caaaatacaa gaagtctgga gaggagacat tgtcttcaga ctacaatgtc cagtttctcc 1620
cctgactca ggcttcttt ggagattaag gccctcaga gatcaacaga ccaacatttt 1680
tctctctc aagcaacact cctagggcct ggcttctgct tgatcaaggc accacacaac 1740
ccagaaagga gctgatgggg cagaatgaac ttaagtatg agaaaagttc agcccaagta 1800
aaataaaaac tcaatcacat tcaattccag agtagtttca agtttcacat cgtaacatt 1860
ttgccccga attc 1874

```

<210> 2

<211> 155

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

10

ES 2 463 482 T3

<210> 3

<211> 923

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 3

```

ggcttcagtt actagctagg ctactgagtt tagttctcag tttggcacct tgataccttt 60
agggtgtgagt gttcccattt ccaggtgagg aactgaggtg caaagagaag ccctgatccc 120
ataaaaaggac aggaatgctg agttccgcca gaccatgcat ctcttgctag taggtgaggc 180
gagtcctctaa ctgattgcag cgtcttctat tttccaggtc aagtacttgc tgctgtcgat 240
attggggcctt gcctttctga gtgaggcggc agctcggaaa atccccaaag taggacatac 300
ttttttccaa aagcctgaga gttgcccgcc tgtgccagga ggtagtatga agcttgacat 360
tggcatcatc aatgaaaacc agcgcgtttc catgtcacgt aacatcgaga gccgctccac 420
ctccccctgg aattacactg tcacttgga cccaaccgg taccctcgg aagttgtaca 480
ggcccagtggt aggaacttgg gctgcatcaa tgctcaagga aaggaagaca tctccatgaa 540
ttcggttccc atccagcaag agaccctggt cgtccggagg aagcaccaag gctgctctgt 600
ttctttccag ttggagaagg tgctggtgac tgttggtgc acctgctca cccctgtcat 660
ccaccatgtg cagtaagagg tgcatatcca ctgagctgaa gaagctgtag aaatgccact 720
ccttaccag tgctctgcaa caagtcctgt ctgaccccca attcctcca cttcacagga 780
ctcttaataa gacctgcacg gatgaaaca taaaatattc acaatgtatg tgtgtatgta 840
ctacacttta ttttgatat ctaaaatggt aggagaaaaa ttaatatatt cagtgcta 900
ataataaagt attaataatg tta                                     923
    
```

10 <210> 4

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 4

```

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

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

ES 2 463 482 T3

<210> 5

<211> 393

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 5

```

atgatcccac gaaatccagg atgcccaaat tctgaggaca agaacttccc ccggactgtg 60
atggtcaacc tgaacatcca taaccggaat accaatacca atcccaaaag gtcctcagat 120
tactacaacc gatccacctc accttggaat ctccaccgca atgaggaccg tgagagatat 180
ccctctgtga tctgggaggc aaagtgccgc cacttgggct gcatcaacgc tgatgggaac 240
gtggactacc acatgaactc tgtccccatc cagcaagaga tcctggtcct gcgcagggag 300
cctccacact gccccaactc cttccggctg gagaagatac tgggtgtccgt gggctgcacc 360
tgtgtcaccg cgattgtcca ccatgtggcc taa 393
    
```

10 <210> 6

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 6

```

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

<210> 7

20 <211> 405

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

25

ES 2 463 482 T3

```

atgCGGaaaa tccccaaagt aggacatact tttttccaaa agcctgagag ttgcccgcct 60
gtgccaggag gtagtatgaa gcttgacatt ggcacatca atgaaaacca gcgcgtttcc 120
atgtcacgta acatcgagag ccgctccacc tccccctgga attacactgt cacttgggac 180
cccaaccggt acccctcgga agttgtacag gcccagtgtg ggaacttggg ctgcatcaat 240
gctcaaggaa aggaagacat ctccatgaat tccgttccca tccagcaaga gaccctggtc 300
gtccggagga agcaccaagg ctgctctggt tctttccagt tggagaaggt gctggtgact 360
gttgctgca cctgcgtcac ccctgtcacc caccatgtgc agtaa 405

```

<210> 8

<211> 134

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

```

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

```

10

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador zc46098

20 <400> 9

actgccatt ctgagggagg tagc 24

<210> 10

25 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador zc46099

<400> 10

cacaggtgca gccaaccttt agga 24

10 <210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> cebador zc44779

<400> 11

20 ggggcccgcct ctaggcacca 20

<210> 12

<211> 25

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador zc44776

30 <400> 12

cggttggcct tagggttcag ggggg 25

<210> 13

35 <211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 463 482 T3

<220>

<223>cebador zc48686

5 <400> 13

tagaaataat tttgtttaac ttttaagaagg agatatatat atgatcccac gaaatccagg 60
atgc 64

<210> 14

<211> 67

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador zc48685

15

<400> 14

tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ttaggccaca tgggggacaa 60
tcggggt 67

20 <210> 15

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador zc42852

<400> 15

30 ctagaataa tttgtttaa ctttaagaag gagatatata tatgcgaaa atccccaaag 60
taggac 66

<210> 16

<211> 48

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

ES 2 463 482 T3

<220>

<223> cebador zc42854

5 <400> 16

tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcatc cgccaaaaca ttactgca 48

<210> 17

10 <211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador zc48895

<400> 17

acaggtgtcc agggaattca tataggccgg ccacatgac tctggaag acctcattg 59

20

<210> 18

<211> 88

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador zc48893

<400> 18

30

gtacaacccc agagctgttt taaggcgcgc ctctagatta atgatgatgg tgatgggtgc 60
cggaggccac atggtggaca atcgggggt 88

<210> 19

<211> 63

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 463 482 T3

<220>

<223> cebador zc48894

5 <400> 19

```
ctccacaggt gtccagggaa ttcatatagg cgggccacca tgacagtgaa gaccctgcat 60
ggc                                                                                   63
```

<210> 20

10 <211> 90

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador zc48892

<400> 20

```
gggtacaacc ccagagctgt ttaaggcgc gcctctagat taatgatgat ggtgatggtg 60
tccggactgc acatggtgga tgacaggggt                                                                                   90
```

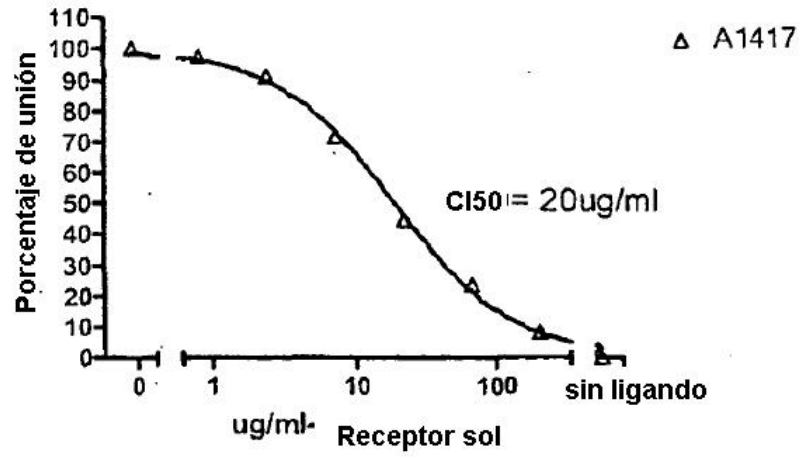
20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal de reactividad cruzada aislado que se une a IL-17A (SEC ID N° 2) y IL-17F (SEC ID N° 4), en el que dicho anticuerpo es producido por el hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la designación de depósito de patentes de la ATCC PTA-7988.
- 5 2. Una versión humanizada del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.
3. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo tiene una región constante humana.
4. Un kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y medios para detectar la unión por dicho anticuerpo.
- 10 5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo, soporte y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. El anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de inflamación seleccionado entre el grupo que consiste en: enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, artritis, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica y esclerosis múltiple.
- 15 7. El hibridoma depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo que tiene la designación de depósito de patentes de la ATCC PTA-7988.

20

Unión competitiva estándar de referencia de hIL-17F a las células



Figura