

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 042**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2009 E 09815646 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.05.2014 EP 2331575**

54 Título: **Anticuerpos contra la IL-17 humana y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**29.09.2008 EP 08017155**

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

**11.09.2014**

73 Titular/es:

**ROCHE GLYCART AG (100.0%)  
Wagistrasse 18  
8952 Schlieren-Zuerich, CH**

72 Inventor/es:

**AUER, JOHANNES;  
DIMOUDIS, NIKOLAOS;  
GEORGES, GUY;  
HANKE, PETRA;  
KNOETGEN, HENDRIK;  
LANGRISH, CLAIRE LOUISE y  
MOESSNER, EKKEHARD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 493 042 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 contra la IL-17 humana y usos de los mismos

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos contra la IL-17A humana (anticuerpo de IL-17), a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y a usos de las mismas.

## Antecedentes de la invención

- 10 La IL-17A humana (CTLA-8, Swiss Prot nº Q16552, denominada además IL-17) es una citoquina proinflamatoria producida por un subgrupo de células T de memoria (denominadas Th17) que se cree participa en la patogénesis de la EM. La IL-17A desempeña un papel en la inducción de otras citoquinas inflamatorias, quimoquinas y moléculas de adhesión. El tratamiento de animales con anticuerpos neutralizadores de IL-17A reduce la incidencia y severidad de la enfermedad en la encefalomiелitis autoinmunitaria (Komiyama Y. *et al.*, J. Immunol. 177:566-573, 2006). IL-17A se sobreexpresa en el líquido cerebroespinal de los pacientes de EM (Hellings P.W. *et al.*, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28:42-50, 2003; Matusevicius D. *et al.*, Multiple Sclerosis 5:101-104, 1999; documento nº WO 2005/051422). Además, los anticuerpos neutralizadores de IL-17A reducen la severidad y la incidencia del modelo de AR de ratón de artritis inducida con colágeno y pueden detectarse niveles elevados de IL-17A en el líquido sinovial de articulaciones inflamadas de pacientes de AR (Ziolkowska M. *et al.*, J. Immunol. 164:2832-2838, 2000; Kotake S. *et al.*, J. Clin. Invest. 103:1345-1352, 1999; Hellings P.W. *et al.*, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 28:42-50, 2003).

Los documentos nº WO 96/17939, nº US 5.716.623, nº WO 95/18826, nº WO 97/15320, nº WO 99/35276, nº WO 00/69436, nº WO 95/18826, nº US 6.274.711, nº WO 97/15320, nº US 6.063.372, nº WO 2006/013107 se refieren a IL-17A y anticuerpos contra IL-17A.

25

## Descripción resumida de la invención

- La invención comprende un anticuerpo que se une a IL-17, caracterizado porque el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de secuencia SEC ID nº 1, una región CDR2 de secuencia SEC ID nº 2, y una región CDR1 de secuencia SEC ID nº 3, y porque el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de secuencia SEC ID nº 4, una región CDR2 de SEC ID nº 5 y una región CDR1 de SEC ID nº 6. Preferentemente el anticuerpo se caracteriza porque el dominio variable de cadena pesada comprende SEC ID nº 7 y el dominio variable de cadena ligera comprende SEC ID nº 8. Preferentemente, el anticuerpo que se une a IL-17 y que se caracteriza por las secuencias de aminoácidos anteriormente indicadas y los fragmentos de secuencia de aminoácidos es del isotipo IgG1 humano modificado en la región bisagra en las posiciones aminoácidas 216 a 240, preferentemente en las posiciones aminoácidas 220 a 240, entre C<sub>H</sub>1 y C<sub>H</sub>2 y/o en la segunda región interdominio en las posiciones aminoácidas 327 a 331 entre C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. Preferentemente, el anticuerpo comprende las mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 234) y L235A. En SEC ID nº 11 se muestra una región constante de cadena pesada preferente que incluye las mutaciones L234A y L235A.

40

Preferentemente el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano. Preferentemente el anticuerpo según la invención inhibe a una concentración de 100 ng/ml de IL-17A de *Cynomolgus* la producción de IL-6 e IL-8 en un ensayo de liberación de citoquinas con un valor de IC<sub>50</sub> de 1,5 nM o inferior, utilizando fibroblastos dérmicos de *Cynomolgus*.

45

Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención. Preferentemente el anticuerpo de la composición farmacéutica se une a IL-17 con una afinidad de por lo menos  $10^{-8} \text{ M}^{-1}$  a  $10^{-12} \text{ M}^{-1}$ , es del isotipo IgG1 humano modificado en la región bisagra en las posiciones aminoácidas 216 a 240, preferentemente en las posiciones aminoácidas 220 a 240, entre C<sub>H</sub>1 y C<sub>H</sub>2, y/o en la segunda región interdominio en las posiciones aminoácidas 327 a 331 entre C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. Preferentemente el anticuerpo es del isotipo IgG1 humano, comprendiendo las mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 234) y L235A.

50

Una realización adicional de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de una composición farmacéutica. Preferentemente el anticuerpo de la composición farmacéutica se une a IL-17 con una afinidad de por lo menos  $10^{-8} \text{ M}^{-1}$  a  $10^{-12} \text{ M}^{-1}$ , es del isotipo IgG1 humano modificado en la región bisagra en las posiciones aminoácidas 216 a 240, preferentemente en las posiciones aminoácidas 220 a 240, entre C<sub>H</sub>1 y C<sub>H</sub>2, y/o en la segunda región interdominio en las posiciones aminoácidas 327 a 331 entre C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3. Preferentemente el anticuerpo es del isotipo IgG1 humano, comprendiendo las mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 234) y L235A.

60

Una realización adicional de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para el tratamiento de la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la soriasis, la enfermedad de Crohn, la enfermedad pulmonar obstructiva

crónica (EPOC), el asma y el rechazo del trasplante. Una realización adicional de la invención es un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención. Preferentemente el anticuerpo de la composición farmacéutica se une a IL-17 con una afinidad de por lo menos  $10^{-8}$  M<sup>-1</sup> a  $10^{-12}$  M<sup>-1</sup>, es del isotipo IgG1 humano modificado en la región bisagra en las posiciones aminoácidas 216 a 240, preferentemente en las posiciones aminoácidas 220 a 240, entre C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, y/o en la segunda región interdominio en las posiciones aminoácidas 327 a 331 entre C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>. Preferentemente el anticuerpo es del isotipo IgG1 humano, comprendiendo las mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 234) y L235A.

Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico codificante de una cadena pesada de un anticuerpo que se une a IL-17, caracterizado porque comprende una región CDR3 de cadena pesada de SEC ID n° 1 y preferentemente las mutaciones L234A y L235A en el dominio constante de cadena pesada de IgG1. Preferentemente el anticuerpo comprende además una región CDR2 de cadena pesada de SEC ID n° 2 y una región CDR1 de SEC ID n° 3. Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico codificante de una cadena ligera de un anticuerpo que se une a IL-17, caracterizado porque comprende una región CDR3 de cadena ligera según la invención y preferentemente las mutaciones L234A y L235A en el dominio constante de cadena pesada de IgG1. Preferentemente el anticuerpo comprende además una región CDR2 de cadena pesada de SEC ID n° 2 y una región CDR1 de SEC ID n° 3. Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico codificante de un anticuerpo según la invención caracterizado porque comprende un dominio variable de cadena pesada de SEC ID n° 7 y un dominio variable de cadena ligera de SEC ID n° 8 y preferentemente las mutaciones L234A y L235A en el dominio constante de cadena pesada de IgG1.

El anticuerpo según la invención se caracteriza porque las cadenas constantes son de origen humano. Dichas cadenas constantes son bien conocidas del estado de la técnica y han sido descritas por Kabat (ver, por ejemplo, Johnson, G. y Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218). Por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID n° 11 con las mutaciones L234A y L235A. Por ejemplo, una región constante de cadena ligera humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa de SEC ID n° 12. Resulta preferente además que el anticuerpo es de origen ratón y comprende el marco de secuencia variable de anticuerpo de un anticuerpo de ratón según Kabat (ver, por ejemplo, Johnson G. y Wu T.T., *Nucleic Acids Res.* 28:214-218, 2000).

El anticuerpo según la invención se caracteriza especialmente porque inhibe la liberación de interleuquina-8 (IL8) de las células CCD25-SK. El anticuerpo según la invención neutraliza específicamente la activación celular mediada por IL17 con un valor de IC<sub>50</sub> de 0,5 nM (16 ng/ml) o inferior. El anticuerpo según la invención se une específicamente a IL17 con un valor de IC<sub>50</sub> de 1 nM o inferior.

El anticuerpo según la invención preferentemente es de isotipo IgG1 humano. Se muestran regiones constantes de cadena pesada y1 preferentes en SEC ID n° 11 y en SEC ID n° 11 sin las mutaciones L234A y L235A.

El anticuerpo según la invención se caracteriza preferentemente porque no se une al factor C1q del complemento humano y por lo tanto evita la función efectora de CDC.

El anticuerpo según la invención preferentemente es de isotipo IgG1 humano modificado en la región bisagra en aproximadamente las posiciones aminoácidas 216 a 240, preferentemente en las posiciones 220 a 240, entre C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub> y/o en la segunda región interdominio en las posiciones aminoácidos 327 a 331 entre C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub>. El anticuerpo según la invención se caracteriza preferentemente por ser de isotipo IgG1 humano, conteniendo por lo menos una mutación en L234 (leucina en la posición aminoácida 234), L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 (numeración según el índice EU). Preferentemente el anticuerpo es del isotipo IgG1 humano, comprendiendo las mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 234) y L235A.

La invención proporciona además vectores de expresión que contienen ácidos nucleicos según la invención capaces de expresar dichos ácidos nucleicos en una célula huésped procariótica o eucariótica, y células huésped que contienen dichos vectores para la producción recombinante de dicho anticuerpo. La invención comprende además una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un vector según la invención. La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo humanizado o humano recombinante según la invención, caracterizado porque se expresa un ácido nucleico según la invención en una célula huésped procariótica o eucariótica y porque se recupera dicho anticuerpo a partir de dicha célula o del sobrenadante del cultivo celular. La invención comprende además el anticuerpo obtenible mediante dicho método recombinante.

Los anticuerpos según la invención muestran ventajas para los pacientes que necesitan terapia con diana en IL-17. Los anticuerpos según la invención presentan nuevas propiedades inventivas que causan un beneficio para los pacientes que sufren de dicha enfermedad inmunológica, especialmente que sufren de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma o rechazo del trasplante. Los anticuerpos según la invención no causan susceptibilidad a infecciones bacterianas estafilocócicas y

entéricas del paciente tratado. La invención proporciona además un método para tratar una paciente que sufre de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma o rechazo del trasplante, que comprende administrar en un paciente diagnosticado con dicha enfermedad (y por lo tanto que necesita dicha terapia) una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a IL-17 según la invención. El anticuerpo se administra preferentemente en una composición farmacéutica. Una realización adicional de la invención es un método para el tratamiento de un paciente que sufre de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma o rechazo del trasplante, caracterizado por la administración en el paciente de un anticuerpo según la invención. La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención para el tratamiento de un paciente que sufre de esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma o rechazo del trasplante, y para la preparación de una composición farmacéutica según la invención. Además, la invención comprende un método para la preparación de una composición farmacéutica según la invención.

La invención comprende además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención, opcionalmente con un tampón y/o un adyuvante útiles para la formulación de anticuerpos con fines farmacéuticos. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo según la invención en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica puede incluirse en un artículo manufacturado o kit.

### Descripción detallada de la invención

El término "anticuerpo" comprende las diversas formas de estructura de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpo. El anticuerpo según la invención preferentemente es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo adicionalmente manipulado genéticamente, con la condición de que se conserven las propiedades características según la invención. La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferentemente el dominio variable del mismo, o por lo menos el sitio de unión de antígeno del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multispecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203:46-52, 1991. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos de cadena sencilla que presentan las características de un dominio  $V_H$ , es decir la capacidad de ensamblarse con un dominio  $V_L$ , o de un dominio  $V_L$  que se une a IL-17, es decir la capacidad de ensamblarse conjuntamente con un dominio  $V_H$  con un sitio de unión de antígeno funcional y proporcionar de esta manera las propiedades de un anticuerpo según la invención. Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos. La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que la región marco y/o las "regiones determinantes de complementariedad" (las CDR) han sido modificadas para comprender la CDR de una inmunoglobulina de especie diferente de la especie de la que procede la inmunoglobulina parental. En una realización preferente, se injerta una CDR de ratón en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, *Nature* 332:323-327, 1988, y Neuberger, M.S. *et al.*, *Nature* 314:268-270, 1985.

La expresión "de unión a IL-17" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la unión del anticuerpo a IL-17 humano en un ensayo de unión ELISA. Se detecta unión en el caso de que el anticuerpo cause una proporción de S/R (señal/ruido) de 7:1 ó superior a una concentración de anticuerpo de 1 mg/ml. El anticuerpo según la invención se une específicamente a IL-17A con un valor de  $IC_{50}$  de 1 nM (0,15 mg/ml) o inferior. El anticuerpo no se une a IL-17 B, C, D, E y F (proporción S/R (señal/ruido) inferior a 7: 1) y por lo tanto se une específicamente a IL-17A. La unión a IL-17A y variantes se lleva a cabo mediante ELISA utilizando IL-17 inmovilizado o variante.

El término "epítipo" se refiere a un determinante del polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos habitualmente consisten de agrupamientos en superficie de moléculas químicamente activos, tales como aminoácidos o cadenas laterales sacáridas y habitualmente los epítipos presentan características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros pero no a los segundos se pierde en presencia de solventes desnaturizantes. Preferentemente, un anticuerpo según la invención se une específicamente a IL-17 nativo pero no desnaturizado. El anticuerpo de IL-17 de la invención se une al mismo epítipo sobre IL-17 al que se une el anticuerpo Mab317. La propiedad de unión a epítipo de un anticuerpo de IL-17 de la presente invención puede determinarse utilizando técnicas conocidas. El anticuerpo de IL-17 se somete a ensayo mediante un ensayo *in vitro* de bloqueo cruzado de unión para determinar la capacidad del anticuerpo de ensayo de dificultar la unión del anticuerpo Mab317 a IL-17. En el caso de que se produzca un desplazamiento del anticuerpo de ensayo por parte del anticuerpo Mab317 de por lo menos 15%, los epítipos se encuentran en estrecha proximidad.

La expresión “dominio variable” (dominio variable de una cadena ligera ( $V_L$ ), dominio variable de una cadena pesada ( $V_H$ )) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada uno de los dominios de la pareja dominio de cadena ligera-dominio de cadena pesada que participa directamente en la unión del anticuerpo al antígeno.

5 Los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas, conectadas mediante tres “regiones hipervariables” (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones de marco adoptan una conformación de hoja  $\beta$  y las CDR pueden formar bucles conectando la estructura de hojas  $\beta$ . Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y por lo tanto proporcionan un objetivo adicional de la invención.

15 La expresión “porción ligante de antígeno de un anticuerpo” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La parte de unión a antígeno de un anticuerpo comprende residuos aminoácidos de las “regiones determinantes de complementariedad”, o “CDR”. Las regiones “de marco” o “FR” son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en la presente memoria. Por lo tanto, los dominios variables de cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión de los antígenos y define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable”.

25 El término “aminoácido” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere al grupo de carboxi alfa-aminoácidos naturales que comprende alanina (código de tres letras: ala, código de una letra: A), arginina (arg, R), asparagina (asn, N), ácido aspártico (asp, D), cisteína (cys, C), glutamina (gln, Q), ácido glutámico (glu, E), glicina (gly, G), histidina (his, H), isoleucina (ile, I), leucina (leu, L), lisina (lys, K), metionina (met, M), fenilalanina (phe, F), prolina (pro, P.), serina (ser, S), treonina (thr, T), triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y valina (val, V).

30 Las expresiones “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico”, tal como se utilizan en la presente memoria, pretenden incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácidos nucleicos puede ser de cadena sencilla o de doble cadena aunque preferentemente es de ADN de doble cadena. Un ácido nucleico se encuentra “operablemente ligado” en el caso de que se sitúe en una relación funcional con otro ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN para un polipéptido en el caso de que se exprese como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se sitúe de manera que facilite la traducción. Generalmente, “operablemente ligado” significa que las secuencias de ADN que resultan ligadas son colineales y, en el caso de un líder secretorio, contiguas y en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que no existan dichos sitios, se utilizan adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional. Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan intercambiamente y todas dichas expresiones incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada.

50 La “parte Fc” de un anticuerpo no participa directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que muestra diversas funciones efectoras. Una “parte Fc de un anticuerpo” es una expresión bien conocida por el experto en la materia y definida basándose en el corte con papaína de los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Según las regiones constantes de cadena pesada, las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. La parte Fc de un anticuerpo se encuentra directamente implicada en la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) basadas en la activación del complemento, la unión de C1q y la unión del receptor Fc. La activación del complemento (CDC) se inicia mediante la unión del factor del complemento C1q a la parte Fc de la mayoría de subclases de anticuerpo IgG. Aunque la influencia de un anticuerpo sobre el sistema del complemento depende de determinadas condiciones, la unión a C1q está causada por sitios de unión definidos en la parte Fc. Dichos sitios de unión son conocidos del estado de la técnica y se describen en, por

ejemplo, Boakle R.J. *et al.*, Nature 282:742-743, 1979; Lukas T.J. *et al.*, J. Immunol. 127:2555-2560, 1981; Brunhous, R. y Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16:907-17, 1979; Burton D.R. *et al.*, Nature 288:338-344, 1980; Thommesen J.E. *et al.*, Mol. Immunol. 37:995-1004, 2000; Idusogie E.E. *et al.*, J. Immunol. 164:4178-4184, 2000; Hezareh M. *et al.*, J. Virology 75:12161-12168, 2001; Morgan A. *et al.*, Immunology 86:319-324, 1995, patente EP nº 0 307 434. Dichos sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (la numeración sigue el índice EU de Kabat, ver posteriormente). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 habitualmente muestran activación del complemento y unión a C1q, mientras que IgG4 no activa el sistema de complemento y no se une a C1q.

El anticuerpo según la invención comprende una parte Fc de origen humano que es la parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1. Para la parte Fc de un anticuerpo según la invención, preferentemente no puede detectarse ninguna unión a C1q tal como se define posteriormente.

Por lo tanto, la invención comprende un anticuerpo según la invención, caracterizada porque dicho anticuerpo se une a IL-17, contiene una parte Fc de origen humano y no se une al factor del complemento humano C1q y, por lo tanto, evita la función efectora de CDC.

Preferentemente un anticuerpo según la invención, con respecto a la unión del receptor de Fc $\gamma$  de subclase IgG1 ó IgG2 humana, con una mutación en L234, L235 y/o D265, y/o contiene la mutación PVA236. Resultan preferentes las mutaciones L234A, L235A, L235E y/o PVA236 (PVA236 se refiere a que la secuencia de aminoácidos ELLG (proporcionada en código de aminoácidos de una letra) entre la posición aminoácida 233 y 236 de IgG1 ó EFLG de IgG4 es sustituida por PVA). De esta manera, la presente invención proporciona un anticuerpo según la invención caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo de la subclase IgG1 humana, que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y/o P329 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo según la invención que contiene una parte Fc derivada de origen humano y que se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo de la subclase IgG1 humana que contiene por lo menos una mutación en L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y en el que el anticuerpo se une a IL-17 con un valor de  $K_D$  inferior a  $10^{-8}$  M en un ensayo BIAcore. En otra realización, el intervalo de  $K_D$  es de entre  $10^{-11}$  y  $10^{-9}$  M.

La unión de C1q puede medirse según Idusogie E.E. *et al.*, J. Immunol. 164:4178-4184, 2000. No se detecta la unión de C1q según la invención en el caso de que en dicho ensayo en el que se recubre una placa de ELISA con diferentes concentraciones del anticuerpo, se añade C1q humano. La unión de C1q se detecta con un anticuerpo dirigido contra C1q humano, seguido de la detección de conjugado marcado con peroxidasa con el sustrato de peroxidasa ABTS<sup>®</sup> (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolín-sulfonato]). No se detecta unión de C1q según la invención en el caso de que la densidad óptica (DO) a 405 nm sea para el anticuerpo de ensayo inferior a 0,05 a una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml.

El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza porque las cadenas constantes son de origen humano. Dichas cadenas constantes son bien conocidas del estado de la técnica y han sido descritas, por ejemplo, por Kabat (ver, por ejemplo, Johnson G. y Wu T.T., Nucleic Acids Res. 28:214-218, 2000). Por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana útil comprende SEC ID nº 23. Por ejemplo, una región constante de cadena ligera humana útil comprende una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa de SEC ID nº 12.

Una realización adicional de la invención es un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo según la invención.

La invención comprende un método para el tratamiento de un paciente que necesita terapia, caracterizada por la administración en el paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención. La invención comprende la utilización de un anticuerpo según la invención para la terapia. La invención comprende la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de un medicamento destinado a la profilaxis y tratamiento de trastornos inflamatorios y trombóticos. La invención comprende la utilización de un anticuerpo según la invención para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, preferentemente para el tratamiento del trastorno pulmonar obstructivo crónico (EPOC), la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide.

Entre los anticuerpos según la invención se incluyen, además, anticuerpos que presentan "modificaciones de secuencia conservadoras" (anticuerpos variantes), modificaciones de secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que no afectan o alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo según la invención. Pueden introducirse modificaciones mediante técnicas estándares conocidas de la técnica, tales como la mutagénesis dirigida a sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Entre las sustituciones conservadoras de aminoácidos se incluyen aquéllas en las que se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica las familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas

laterales similares. Entre estas familias se incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De esta manera, un residuo aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-IL-17 humano puede sustituirse preferentemente por otro residuo aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Un anticuerpo anti-IL-17 "variante" se refiere en la presente memoria, por lo tanto, a una molécula que presenta una secuencia de aminoácidos diferente de una secuencia "parental" de aminoácidos de anticuerpo anti-IL-17 en hasta 10, preferentemente en aproximadamente entre dos y aproximadamente cinco adiciones, deleciones y/o sustituciones en una o más regiones variables del anticuerpo parental. Pueden llevarse a cabo sustituciones de aminoácidos mediante mutagénesis basándose en el modelaje molecular, tal como describen Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Queen C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989.

Una realización adicional de la invención es un método para la producción de un anticuerpo contra IL-17 que no se une al receptor de Fcγ y/o C1q, caracterizado porque la secuencia de un ácido nucleico codificante de la cadena pesada de un anticuerpo de tipo IgG1 humano de unión a IL-17 se modifica de manera que dicho anticuerpo modificado no se une a C1q y/o al receptor de Fcγ, dicho ácido nucleico modificado y el ácido nucleico codificante de la cadena ligera de dicho anticuerpo se insertan en un vector de expresión, dicho vector se inserta en una célula huésped eucariótica, la proteína codificada se expresa y se recupera a partir de la célula huésped o del sobrenadante.

La identidad u homología con respecto a la secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los de la secuencia parental, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia del anticuerpo debe interpretarse que afecta a la identidad o a la homología de secuencia. La variante conserva la capacidad de unirse a IL-17 humana y preferentemente presenta propiedades que son superiores a las del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede presentar efectos secundarios reducidos durante el tratamiento.

El anticuerpo "parental" comprende las regiones CDR del anticuerpo 3C1 y preferentemente se utiliza para la preparación de la variante. Preferentemente, el anticuerpo parental presenta una región marco humana y, en caso de encontrarse presente, presenta una región constante de anticuerpo humano o dominios constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

Los anticuerpos según la invención preferentemente se producen por medios recombinantes. Dichos métodos son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el posterior aislamiento del polipéptido anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, se insertan ácidos nucleicos codificantes de cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas en vectores de expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas, tales como las células CHO, las células NS0, las células SP2/0, las células HEK293, las células COS, las levaduras o las células de E. coli, y el anticuerpo se recupera a partir de las células (del sobrenadante o tras la lisis de las células). La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida del estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides S.C., Protein Expr. Purif. 17:183-202, 1999; Geisse S. *et al.*, Protein Expr. Purif. 8:271-282, 1996; Kaufman R.J., Mol. Biotechnol. 16:151-160, 2000; Werner R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880. Los anticuerpos pueden encontrarse presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o en forma sustancialmente pura. Se lleva a cabo la purificación con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo la cromatografía de columna y otras bien conocidas de la técnica. Ver Ausubel F. *et al.*, editor, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987. La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes, L.M. *et al.*, Cytotechnology 32:109-123, 2000; Barnes, L.M. *et al.*, Biotech. Bioeng. 73:261-270, 2001. La expresión transitoria se describe en, por ejemplo, Durocher, Y. *et al.*, Nucl. Acids Res. 30:E9, 2002. Se describe la clonación de dominios variables en Orlandi R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989; Carter P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289, 1992; Norderhaug L. *et al.*, J. Immunol. Methods 204:77-87, 1997. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK293) se describe en Schlaeger E.-J. y Christensen K., Cytotechnology 30:71-83, 1999, y en Schlaeger E.-J., J. Immunol. Methods 194:191-199, 1996. Se separan convenientemente anticuerpos monoclonales del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencian fácilmente mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped, tales como

células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

5 Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de IL-17 humano mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ADN codificante del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Sin embargo, estas modificaciones únicamente pueden llevarse a cabo bajo condiciones muy limitadas, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo, tales como el isotipo de IgG y la unión de epítopos, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación. También puede sustituirse cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-IL-17, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamientos aberrantes. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente en el caso de que el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv). Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón original de glucosilación del anticuerpo. El término "alteración" se refiere a eliminar una o más fracciones de carbohidrato presentes en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el anticuerpo. La glucosilación de los anticuerpos típicamente es ligada a N. La expresión "ligada a N" se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. De esta manera, la presencia de cualquier de dichas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente indicadas (para los sitios de glucosilación ligada a N).

25 Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IL-17 se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o sitio-dirigida), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis por inserción de casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante de anticuerpo anti-IL-17 humanizado.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de entre una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera indicada en las patentes US nº 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337.

40 Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera según la invención se combinan con secuencias de promotor, de inicio de traducción, región constante, región 3' no traducida, de poliadenilación y de terminación de transcripción para formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de cadena pesada y de cadena ligera pueden agruparse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse separadamente en células huésped que seguidamente se fusionan para formar una única célula huésped que exprese ambas cadenas.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o la parte ligante de antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción/resorción y similares, que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente el portador resulta adecuado para la inyección o la infusión. Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Entre los portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida de la técnica. Además de agua el portador puede ser, por ejemplo, una solución salina tamponada isotónica. Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma convenientemente hidratada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte eficaz para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin resultar tóxico para el paciente (cantidad eficaz). El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, o el éster, sal o amida

de las mismas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular utilizado, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y la historia médica anterior del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de las técnicas médicas.

5 La invención comprende la utilización de los anticuerpos según la invención para el tratamiento de un paciente que sufre de esclerosis múltiple, artritis reumatoide (AR), soriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y rechazo del trasplante.

10 Una realización adicional de la invención es la utilización de un anticuerpo anti-IL-17, preferentemente un anticuerpo según la invención, para el tratamiento de un paciente que sufre de artritis reumatoide, respondiendo moderadamente o no respondiendo dicho paciente al tratamiento con un antagonista de TNF, anticuerpo anti-CD20, CTLA4-Ig o anticuerpo anti-IL-6. Una realización adicional de la invención es la utilización de un anticuerpo anti-IL-17, preferentemente un anticuerpo según la invención, para la preparación de un medicamento destinado al  
15 tratamiento de un paciente que sufre de artritis reumatoide, respondiendo moderadamente o no respondiendo dicho paciente al tratamiento con un antagonista de TNF, anticuerpo anti-CD20, CTLA4-Ig o anticuerpo anti-IL-6. Los antagonistas de TNF para el tratamiento de la AR son, por ejemplo, infliximab (IFX, Remicade<sup>®</sup>), etanercept (ETA, Enbrel<sup>®</sup>) y adalimumab (ADA, Humira<sup>®</sup>). El anticuerpo anti-IL-17 preferentemente se administra en el paciente que responde moderadamente o no responde a un tratamiento con un antagonista de TNF, anticuerpo anti-CD20, CTLA4-Ig o anticuerpo anti-IL-6 durante como mínimo 3 meses, preferentemente durante 6 meses.

La invención proporciona además un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo según la invención conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable y la utilización del anticuerpo según la invención para dicho método. La invención proporciona además la  
25 utilización de un anticuerpo según la invención en una cantidad eficaz para la preparación de un agente farmacéutico, preferentemente conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de un paciente que sufre esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y rechazo del trasplante. La invención proporciona además la utilización de un anticuerpo según la invención en una cantidad eficaz para la preparación de un agente farmacéutico, preferentemente conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de un paciente que sufre esclerosis múltiple, artritis reumatoide, soriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y rechazo del trasplante.

### Descripción de las secuencias

35	SEC ID nº 1	CDR3 de cadena pesada, Mab 106 y Mab 107
	SEC ID nº 2	CDR2 de cadena pesada, Mab 106
	SEC ID nº 3	CDR1 de cadena pesada, Mab 106 y Mab 107
	SEC ID nº 4	CDR3 de cadena ligera, Mab 106 y Mab 107
	SEC ID nº 5	CDR2 de cadena ligera, Mab 106 y Mab 107
	SEC ID nº 6	CDR1 de cadena ligera, Mab 106 y Mab 107
	SEC ID nº 7	dominio variable de cadena pesada, Mab 106
	SEC ID nº 8	dominio variable de cadena ligera, Mab 106 y Mab 107
	SEC ID nº 9	CDR2 de cadena pesada, Mab 107
	SEC ID nº 10	dominio variable de cadena pesada, Mab 106
	SEC ID nº 11	región constante de cadena pesada $\gamma$ 1
	SEC ID nº 12	región constante de cadena ligera $\kappa$

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

40 Descripción de la inmunización

Se llevó a cabo una inmunización dentro de las primeras 20 semanas en 5 ratones Balb/c hembra utilizando 250 (1x) y 100 mg (3x) de IL-17 humana recombinante de Preprotech (<http://www.preprotech.com>, nº de cat. 200-17 en PBS al 1% con albúmina al 1%) en cada ratón.

#### Ejemplo 2

#### Unión a IL-17 medida mediante ELISA

50

Se recubrieron placas NUNC® Maxisorp (de 96 pocillos) con IL-17 humana recombinante (Preprotech n° 200-17, www.prepro-tech.com) a una concentración de 0,5 mg/ml en PBS (100 ml/pocillo). Las placas se incubaron a 37°C en un agitador orbital bajo agitación durante 2 horas. A continuación se eliminó la solución de recubrimiento y se añadieron 100 µl/pocillo de PBSTC (solución salina tamponada con fosfato, Tween®20 al 0,05%, suero de pollo al 2%). Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminó la solución de bloqueo y se añadieron a la placa las muestras (100 µl/pocillo) (blanco: PBSTC, muestras (10 µg/ml en PBS): anticuerpos anti-IL-17 humana 3C1 y Mab 106 según la invención; Mab 16-7178-85 de eBioscience (www.ebioscience.com), MAB 317 de R&D Systems (www.rn-dsystems.com), NVP-AIN-497 (documento n° WO 2006/013107). Las placas se incubaron a temperatura ambiente bajo agitación. Se extrajeron las muestras, se lavaron las placas tres veces con 200 µl/pocillo de PBST (solución salina tamponada con fosfato, Tween® 20 al 0,05%) y se añadió anticuerpo secundario (IgG de cabra antiratón, Fc gamma, conjugado con HRP; Chemicon AP127P, www.millipore.com) para la detección de anticuerpos de ratón o IgG de cabra antihumano, Fc gamma, conjugado con HRP (Chemicon AP113P) para la detección de anticuerpos humanizados. Se diluyó el anticuerpo secundario 1:10000 en PBSTC y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación. Se eliminó el anticuerpo secundario, se lavaron las placas tres veces con 200 µl/pocillo de PBST (solución salina tamponada con fosfato, Tween®20 al 0,05%) y se añadieron 100 µl/pocillo de ABTS® (Roche Diagnostics GmbH). Se midió la densidad óptica a 405/492 nm en relación a la unión de IL-17A (que se fijó como 100%). La unión a otros subtipos de IL-17 humana (IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F) se llevó a cabo con el mismo formato de ensayo. Se muestran los resultados en la Tabla 1.

20

**Tabla 1:**

Anticuerpo	Unión (se fijó la unión de IL-17A en 100)					
	IL17A	IL17B	IL17C	IL17D	IL17E	IL17F
3C1	100	0	1	0	0	0
106	100	0	0	0	1	0
Mab 317	100	0	0	0	0	0
16-7178-85	100	7	97	6	5	5
NVP-AIN-497	100	2	2	0	3	62

**Ejemplo 3****25 Preparación de un plásmido de expresión para una inmunoglobulina de clase IgG1**

El plásmido 6454 (indicado como p6454 en lo sucesivo) es el plásmido de expresión para la expresión de un anticuerpo anti-IL-17 (casete de expresión organizado genómicamente con organización exón-intrón conservada) en células eucarióticas. Comprende los elementos funcionales siguientes:

- 30
- un origen de replicación derivado del vector pUC 18 (origen de pUC),
  - un gen β(beta)-lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina en *E. coli* (Amp),
  - un casete de expresión para la expresión de la cadena pesada gamma-1 que comprende los elementos siguientes:
 

35

    - el promotor inmediato-temprano mayor y el intensificador del citomegalovirus humano (promotor IE1 del CMV\_h),
    - un 5'UTR sintético que incluye una secuencia de Kozak,
    - una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal (L1\_Intrón\_L2),

40

    - el ADNc para la región variable de cadena pesada (VH) dispuesta con un sitio donante de procesamiento en el extremo 3',
    - la región intensificadora µ de inmunoglobulina de ratón, -el gen de cadena pesada gamma-1 de inmunoglobulina humana (IGHG1), incluyendo los exones CH1, bisagra, CH2 y CH3, intrones intermedios y 3'UTR portador de la secuencia de señal de poliadenilación,

45

    - un casete de expresión para la expresión de la cadena ligera kappa que comprende los elementos siguientes:
      - el promotor inmediato-temprano mayor y el intensificador del citomegalovirus humano (promotor IE1 del CMV\_h), -un 5'UTR sintético que incluye una secuencia de Kozak,
      - una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal (L1\_Intrón\_L2),

50

    - el ADNc para la región variable de cadena ligera dispuesta con un sitio donante de procesamiento en el extremo 3' (VL),
    - la región intensificadora intrónica de Ig-kappa de ratón,
    - el gen de inmunoglobulina kappa humana (IGK) que incluye el exón IGKC y el 3'UTR de IGF que porta la secuencia de señal de poliadenilación,

55

    - un casete de expresión para la expresión de la dihidrofolato reductasa (DHFR) murina adecuada para la selección auxotrófica en células eucarióticas, que incluye:

- una versión acortada del promotor temprano y origen de SV40,
- la secuencia codificante de la DHFR murina,
- la señal de poliadenilación temprana de SV40.

5 Se transfectó P6454 en células CHO-K1 y se aislaron líneas celulares estables tras la selección con metotrexato (MTX) y se cribaron para la producción de anticuerpos humanos mediante ELISA para IgG humana.

#### Ejemplo 4

#### 10 Investigación de la activación del sistema del complemento (ELISA de unión de C1q)

Con el fin de investigar la unión de C1q de un anticuerpo según la invención, se utilizó un enfoque de ELISA. C1q es parte del sistema inmunológico adaptativo y, tras la unión a complejos inmunológicos, induce la activación secuencial de varios zimógenos. Los enzimas, a su vez, provocan el corte de las moléculas C3, lo que puede resultar en el inicio de reacciones inflamatorias, la opsonización de partículas foráneas o aberrantes y la lisis de membranas celulares.

Se recubre una MTP (Nunc) con los anticuerpos que deben someterse a ensayo en tampón de PBS durante la noche a 4°C a 7 concentraciones entre 10 µg/ml y 0,156 µg/ml, 100 µl/pocillo. El bloqueo de los sitios de unión libres se lleva a cabo con BPLA al 3% (Roche) en PBS durante 1 h a TA, 200 µl/pocillo. La MTP se incubó con 2 µg/ml de C1q (Quidel) en BPLA al 3% en PBS, 100 µg/ml. Se lavó la MTP 3 veces a TA con Tween®20 al 0,1% en PBS. Se detectó la unión mediante la adición de anticuerpo de conejo policlonal anti-C1q (DAKO) a una concentración de 0,25 µg/ml en BPLA al 3%, Tween®20 al 0,1% en PBS, 100 µl/pocillo durante 1 h a TA. Se lavó la MTP 3 veces a TA con Tween®20 al 0,1% en PBS. El anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo-POD (Jackson ImmunoResearch) se añadió a una concentración de 0,1 µg/ml en Tween-20 al 3% en PBS durante 1 h a TA, 100 µl/pocillo. Tras lavar la MTP 3 veces con Tween-20 al 0,1% en PBS a TA, se incubó la MTP con solución de ABTS (Roche) y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm con una longitud de onda de referencia de 490 nm. Se determinaron las señales de fondo en pocillos no recubiertos con anticuerpos pero tratados mediante el mismo procedimiento de detección. No se detectó unión de C1q en el caso de que la densidad óptica (DO) a 405 nm para el anticuerpo de ensayo fuese inferior a 0,05 a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml.

#### Ejemplo 5

#### 35 Mapeado de la región epitópica mediante experimentos de bloqueo cruzado BIAcore

Todas las mediciones se llevaron a cabo utilizando el instrumento BIAcore 3000 a 25°C. El sistema y el tampón para muestras era HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, polisorbato-20 al 0,005% (v/v)). Un chip sensor CM5 BIAcore se sometió a un procedimiento de preacondicionado. Secuencialmente se inyectaron SDS al 0,1%, NaOH 50 mM, HCl 10 mM y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM durante 30 s sobre las celdas de flujo FC1, FC2, FC3 y FC4. El procedimiento de acoplamiento de aminas se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el software BIAcore 3000 wizard v 4.1.

Con el fin de llevar a cabo los experimentos de bloqueo cruzado con anticuerpos quiméricos o humanizados, tras la activación con EDC/NHS de la superficie sensora, se inmovilizó un anticuerpo de cabra policlonal anti-IgG humano (Jackson) en todas las celdas de flujo (CF) sensoras. Se utilizaron 30 µg/ml de anticuerpo de cabra policlonal anti-IgG humano en NaAc 10 mM, pH 5,0, a un caudal de 10 µl/min durante 7 min para inmovilizar 10.000 UR del sistema de captura de anticuerpos. La superficie se desactivo mediante saturación con etanolamina. El sensor del sistema de captura humano se acondicionó con 5 ciclos de unión de analito IgG<sub>hu</sub> (Bayer) a un caudal de 10 µl/min durante 2 min y regeneración con glicina 10 mM, pH 1,7 a un caudal de 30 µl/min durante 3 min.

A un caudal de 10 µl/min, se inyectó el mAb primario durante 3 min en CF1-CF4. Se bloqueó la capacidad de unión libre del sistema de captura del sensor utilizando una inyección de 3 min en CF1-CF4 a un caudal de 10 µl/min de un cóctel de 50 µg/ml de IgG<sub>hu</sub> (Bayer) en tampón HBS-EP. A continuación se inyectó el antígeno IL17-A<sub>rhu</sub> a un caudal de 10 µl/min durante 3 min en CF1-CF4 para saturar la capacidad de unión de los anticuerpos primarios. Se llevó a cabo una segunda inyección en CF1-CF4 a un caudal de 30 µl/min durante 3 min antes de inyectar separadamente los anticuerpos secundarios a un caudal de 30 µl/min durante 3 min en las celdas de flujo CF1, CF2, CF3 y CF4. Se regeneró el sensor utilizando glicina 10 mM, pH 1,75, a un caudal de 30 µl/min durante 3 min.

En primer lugar se restó la inyección de analito 0 nM de todos los sensogramas con el fin de corregir la disociación de los anticuerpos primarios del sistema de captura de anticuerpo de cabra policlonal anti-IgG humana. Se formó un cociente entre la señal de respuesta del anticuerpo secundario y del anticuerpo primario. El cociente recibe el nombre de Proporción molar (PM) e indica la accesibilidad de la región epitópica.

Los valores de Proporción molar se listaron en una matriz. Las combinaciones homólogas de mAb sirvieron de control de si los procedimientos de bloqueo se habían realizado con éxito. Se definió el valor de corte a partir de las combinaciones homólogas de mAb.

- 5 Se fijó el valor de corte en los experimentos de bloqueo cruzado en el formato de ensayo homogéneo de Mab106 (9%). Los valores de proporción molar superiores a PM=15% se refieren al acceso a epítomos independientes.

Los resultados del mapeado de epítomos (ver Tab. 2) indican que Mab K106 y su derivado Mab107 se unen a una región epitópica diferente de NVP-AIN-497.

10

Además, Mab K106 cubre un epítomo diferente que eBio64CAP17 y la misma región epitópica que Mab317.

**Tabla 2:**

Resultados del mapeado de epítomos		
Anticuerpo 1	Anticuerpo 2	Proporción molar [%]
eBio64CAP17	106	41
NVP-AIN-497	106	17
Mab317	106	11
NVP-AIN-497	107	21
Mab317	Mab317	0
106	106	9
eBio64CAP17	eBio64CAP17	7
NVP-AIN-497	NVP-AIN-497	6

15

El valor de corte del análisis se define con las combinaciones de ensayo homogéneo. (106,9%); (AIN-457, 6%); (eBio64CAP17, 7%); (Mab317, 0%). En este caso el valor de corte se fijó en el ensayo de Mab106 homogéneo.

#### Ejemplo 6

20

#### Ensayo de liberación de citoquinas, inhibición de la liberación de IL-8\_h inducida por IL-17A

Se llevó a cabo el ensayo como detección de la producción de IL-8\_h por células CCD-25SK tras la estimulación con IL-17A y TNF-alfa con preincubación de anticuerpos anti-IL-17. Las células CCD-25SK presentan el receptor de IL-17. IL-17A soluble se une a estos receptores de IL-17. Los anticuerpos contra IL-17A se unen a IL-17A. El mecanismo sólo funciona en presencia de TNFalfa. Mediante la unión de IL-17A al receptor de IL-17, las células producen IL-8\_h, que puede detectarse mediante ELISA como lectura. La IL-8\_h medida proporciona la información en la que las concentraciones de anticuerpos anti-IL-17 inhiben la estimulación de las células CCD-25SK por IL-17.

25

30 Se sembraron células CCD-25SK a una densidad celular de  $2,5 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 48 pocillos (volumen: 0,45 ml/pocillo) y se incubaron durante 24 h a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación durante la noche, las células se trataron con anticuerpos anti-IL-17 durante 30 minutos con concentraciones finales de 9.000, 3.000, 1.000, 333,3, 111,1, 37,03, 12,34 y 4,11 ng/ml. Cada serie de dilución de anticuerpos se preparó con medio, 50 µl/pocillo (concentrado 10x). Tras 30 min, las células se estimularon con una mezcla de 10 ng/ml de IL-17A y 50 pg/ml de TNF-alfa. 50 µl/pocillo (concentrado 10x) y se incubó durante 24 h a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación durante la noche, los sobrenadantes se transfirieron a placas de 96 pocillos y se congelaron a -20°C como intermediarios para el ELISA de IL-8\_h.

35

40 Se llevó a cabo el ELISA de IL-8\_h de la manera siguiente. Se añadieron 100 µl de anticuerpo de captura diluido a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 4°C. Se realizaron las diluciones con tampón de recubrimiento. Se aspiraron las placas, se lavaron con 200 µl/pocillo 3 veces, se bloquearon con 200 µl/pocillo de diluyente de ensayo y se incubaron durante 1 h a TA. Se aspiraron las placas y se lavaron con 200 µl/pocillo 3 veces. Se añadieron 100 µl de estándar y de muestras y se incubaron durante 2 h a TA. Serie estándar de dilución: 400 pg/ml, 200 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,3 pg/ml y diluyente de ensayo a modo de control negativo. La dilución de las muestras era de 1:200. Se aspiraron las placas y se lavaron con 250 µl/pocillo 4 veces. Se añadieron 100 µl de conjugado a cada pocillo. Se preparó el conjugado con anticuerpo de detección y reactivo enzimático diluido 1:250 en diluyente de ensayo. Se aspiraron las placas y se lavaron con 250 µl/pocillo 6 veces. Se añadieron 100 µl de sustrato a cada pocillo y se incubaron durante 12 minutos. Tras la incubación, se detuvo la reacción con 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Se llevó a cabo la lectura a 450 nm en 30 min con corrección de λ a 570 nm. Se muestran los resultados en la Tabla 3 (valores de IC<sub>50</sub> medidos en relación a una inhibición máxima del 80%)

40

45

50

**Tabla 3:**

Anticuerpo	IC <sub>50</sub> de neutralización de IL-6 (nM)	IC <sub>50</sub> de neutralización de IL-8 (nM)
3C1	1,0	1,0
106	1,0	1,0
Mab 317	5,5	5,5

**Ejemplo 7**

5

**Inhibición de liberación de citoquinas de sinoviocitos de IL-6\_h y IL-8\_h inducidas por IL-17A**

Las células sinoviocitos de tipo fibroblasto humano primario (HFLS) producen IL-6\_h e IL-8\_h en respuesta a la estimulación con IL-17A. El ensayo se llevó a cabo para medir la inhibición de esta producción de IL-6\_h e IL-8\_h estimulada por IL-17A por parte de células HFLS tras la preincubación de las células con anticuerpos anti-IL-17 antes de la estimulación.

Se sembraron las células HFLS a una densidad celular de  $4 \times 10^5$  células/ml en un volumen de 0,5 ml en una placa de 48 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para adherirse. Tras la incubación durante la noche, se sustituyeron los medios por 400 µl de medio fresco y las células se trataron con anticuerpos anti-IL-17 durante 30 minutos en un abanico de concentraciones de anticuerpo (10.000, 3.000, 1.000, 300, 100, 30, 10, 3, 0 ng/ml). Cada serie de dilución de anticuerpos se preparó con medio utilizando 50 µl/pocillo (concentrado 10x). Tras 30 min, las células se estimularon con 100 ng/ml de IL-17A (50 µl de concentración 1.000 ng/ml 10x) y se incubaron durante la noche (18 h) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras el periodo de incubación, se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos y se analizaron inmediatamente o se almacenaron a -80°C hasta el análisis mediante ELISA. Para los ELISA de IL-6\_h y de IL-8\_h, se añadieron 100 µl de anticuerpo de captura diluido a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 4°C. Se realizaron las diluciones con tampón de recubrimiento. Se aspiraron las placas, se lavaron con 200 µl/pocillo 3 veces, se bloquearon con 200 µl/pocillo de diluyente de ensayo y se incubaron durante 1 h a TA. Se aspiraron las placas y se lavaron con 200 µl/pocillo 3 veces. Se añadieron 100 µl de estándar y de muestras y se incubaron durante 2 h a TA según las instrucciones del fabricante. Se aspiraron las placas y se lavaron con 250 µl/pocillo por lo menos 3 veces. Se añadieron 100 µl de conjugado a cada pocillo. Se preparó el conjugado con anticuerpo de detección y reactivo enzimático diluido 1:250 en diluyente de ensayo. Se aspiraron las placas y se lavaron con 250 µl/pocillo por lo menos 3 veces. Se añadieron 100 µl de sustrato a cada pocillo y se incubaron hasta el desarrollo de suficiente color para la lectura. Tras la incubación se detuvo la reacción con 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se leyó en el lector de placas a una longitud de onda de 450 nm en 30 min. Se muestran los resultados en la Tabla 4.

**Tabla 4:**

Anticuerpo	IC <sub>50</sub> de neutralización de IL-6 (nM) (utilizando 100 ng/ml de IL-17A)	IC <sub>50</sub> de neutralización de IL-8 (nM) (utilizando 100 ng/ml de IL-17A)
3C1	1,9	1,4
106	2,1	1,6
NVP-AIN-457	5,0	4,2

35

**Ejemplo 8****Reactividad cruzada con IL-17A de Cynomolgus (ensayo de unión)**

Se llevó a cabo el ensayo de unión según el Ejemplo 2. Se muestran los resultados en la Tabla 5.

40

**Tabla 5:**

Anticuerpo	Unión relativa a IL-17A humana	Unión relativa a IL-17A de Cynomolgus
3C1	1	n.d.
106	1	0,87
106 (IgG4)	1	0,87
106 (IgG1-LALA)	1	1,0
NVP-AIN-497	1	0,6

**Ejemplo 9****Ensayo de liberación de citoquinas en mono Cynomolgus (*Maccaca fascicularis*), inhibición de la producción de IL-6 e IL-8 inducida por IL-17A de Cynomolgus**

Las células fibroblastos dérmicos de Cynomolgus (CDF) producen IL-6 e IL-8 de Cynomolgus en respuesta a la estimulación con IL-17A humana o de Cynomolgus. El ensayo se llevó a cabo para medir la inhibición de dicha producción de IL-6 e IL-8 estimulada por IL-17A de Cynomolgus por parte de células CDF tras la preincubación de las células con anticuerpos anti-IL-17 preparados contra IL-17 humana antes de la estimulación.

Se sembraron las células CDF a una densidad celular de  $2 \times 10^5$  células/ml en un volumen de 0,5 ml en una placa de 48 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para adherirse. Tras la incubación durante la noche, se sustituyeron los medios por 400 µl de medio fresco y las células se trataron con anticuerpos anti-IL-17 durante 30 minutos en un abanico de concentraciones de anticuerpo (10.000, 3.000, 1.000, 300, 100, 30, 10, 3, 0 ng/ml). Cada serie de dilución de anticuerpos se preparó con medio utilizando 50 µl/pocillo (concentrado 10x). Tras 30 min, las células se estimularon con 100 ng/ml de IL-17A (50 µl de concentración 1.000 ng/ml 10x) y se incubaron durante la noche (18 h) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras el periodo de incubación, se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos y se analizaron inmediatamente o se almacenaron a -80°C hasta el análisis mediante ELISA. Se demostró que IL-6<sub>h</sub> e IL-8<sub>h</sub> en ELISA presentaban reactividad cruzada con las citoquinas de Cynomolgus respectivas y se utilizaron para cuantificar los niveles de las citoquinas. Para los ELISA, se añadieron 100 µl de anticuerpo de captura diluido a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 4°C. Se realizaron las diluciones con tampón de recubrimiento. Se aspiraron las placas, se lavaron con 200 µl/pocillo 3 veces, se bloquearon con 200 µl/pocillo de diluyente de ensayo y se incubaron durante 1 h a TA. Se aspiraron las placas y se lavaron con 200 µl/pocillo 3 veces. Se añadieron 100 µl de estándar y de muestras y se incubaron durante 2 h a TA según las instrucciones del fabricante. Se aspiraron las placas y se lavaron con 250 µl/pocillo por lo menos 3 veces. Se añadieron 100 µl de conjugado a cada pocillo. Se preparó el conjugado con anticuerpo de detección y reactivo enzimático diluido 1:250 en diluyente de ensayo. Se aspiraron las placas y se lavaron con 250 µl/pocillo por lo menos 3 veces. Se añadieron 100 µl de sustrato a cada pocillo y se incubaron hasta el desarrollo de suficiente color para la lectura. Tras la incubación se detuvo la reacción con 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y se leyó en el lector de placas a una longitud de onda de 450 nm en 30 min. Se muestran los resultados en la Tabla 6.

**Tabla 6:**

Anticuerpo	IC <sub>50</sub> de neutralización de IL-6 (nM) (utilizando 100 ng/ml de IL-17A)	IC <sub>50</sub> de neutralización de IL-8 (nM) (utilizando 100 ng/ml de IL-17A)
3C1	1,3	1,1
106	0,7	0,6
NVP-AIN-457	>10	>10

**Ejemplo 10****Ensayo de ADCC basado en europeo**

Se aislaron PBL mediante centrifugación en gradiente de Ficoll Paque Plus: Se diluyó 1:1 con PBS una muestra de sangre heparinizada. Se aplicaron 8 ml de la sangre diluida en una capa sobre Ficoll y se centrifugaron durante 30 min a 800g. Se recogieron las células (PBL), se lavaron con RPMI1640/FCS al 10% y se resuspendieron en medio de cultivo celular. Las células se diluyeron a  $2,5 \times 10^6$  células/ml (lo anterior resulta en una proporción de efectores/diana de 25:1, ya que se utilizaron  $5 \times 10^3$  células diana por cada pocillo).

Las células diana se marcaron con BADTA (acetoxi-metil-éster de ácido 2,2':6,2''-terpiridín-6,6''-dicarboxílico): las células se recolectaron mediante la adición de Accutase™ (Millipore), se lavaron una vez y se diluyeron a  $1 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 2,5 ml de BADTA/ $1 \times 10^6$  células y se incubaron durante 35 min a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Tras el periodo de marcaje, las células se diluyeron con 10 ml de medio de cultivo, se centrifugaron a 200g durante 10 min y se aspiró el sobrenadante. Esta etapa se repitió 3x con medio de cultivo/probenicid 2 mM y la muestra se diluyó a  $1 \times 10^5$  células/ml, se centrifugó a 300g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se pipetearon 50 µl en los pocillos destinados a los controles de fondo.

**Fondo:** la alícuota de 50 µl, diluida con 100 µl de medio. **Lisis espontánea:** 50 µl de la suspensión celular diana marcada; adición de 100 µl de medio de cultivo e incubación 2 h/37°C al igual que el resto de muestras. **Lisis máxima:** 50 µl/pocillo de la suspensión celular diana marcada; adición de 100 µl de Triton® X-100 (al 0,5% en PBS) e incubación 2 h/37°C. **Control de lisis sin anticuerpos:** 50 µl/pocillo de la suspensión celular diana marcada; adición de 50 µl de medio de cultivo; adición de 50 µl de células efectoras, 2 h a 37°C. **Control de lisis sin células**

**efectoras:** 50 µl/pocillo de la suspensión celular diana marcada; adición de 50 µl de medio de cultivo, adición de 50 µl de solución de anticuerpo a la concentración más alta utilizada e incubación 2 h/37°C.

5 Al final del periodo de incubación se centrifugó la placa de 96 pocillos a 100 rpm. Se transfirieron 20 µl de cada sobrenadante a una OptiPlate™. Se añadieron HTRF-96 (Packard) y 200 µl de solución de europio y se incubó durante 15 min en un agitador. Se midió la fluorescencia como fluorescencia con resolución temporal y se calcularon la liberación espontánea y la liberación específica según la fórmula a continuación:

$$\text{Liberación específica (\%)} = \frac{\text{lisis específica (n}^\circ\text{)} - \text{lisis espontánea (n}^\circ\text{)}}{\text{lisis máxima (n}^\circ\text{)} - \text{lisis espontánea (n}^\circ\text{)}} \times 100$$

10 No se midió liberación específica significativa (ADCC) tras la adición del anticuerpo 106.

### Ejemplo 11

#### Ensayo de CDC

15 Se recolectaron células mediante la adición de tripsina, se lavaron, se diluyeron a  $1 \times 10^5$  células/ml y se añadieron 100 µl/pocillo a una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Se añadió anticuerpo (complejo de anticuerpo-ligando, respectivamente) a una concentración de 6 veces en un volumen de 25 µl de medio. Tras un tiempo de incubación de 30 min, se añadieron 25 µl de complemento de conejo neonato recién disuelto (Cedarlane CL3441, 1 ml de liofilizado, diluido al momento en 4 ml de agua doblemente destilada) a una concentración final de complemento de 1:24. Tras un periodo de incubación de 20 h, se extrajeron 50 µl de sobrenadante y se añadieron 20 100 µl de reactivo Cell Titer Glo® (Promega Corp.) a los 100 µl de sobrenadante remanentes. Se agitó la placa durante 2 min en un agitador orbital, se transfirieron 100 µl/pocillo a una placa de microtitulación negra de luminiscencia (Costar) y se midió la luminiscencia.

25 **Controles:** control de medio (células diana + 50 µl de medio); lisis máxima (células diana + 50 µl de Triton X-100 al 0,5%), control de complemento (células diana + 25 µl de medio + 25 µl de complemento).

Resultados: no pudo detectarse citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) con el anticuerpo anti-IL-17 106.

### 30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Anticuerpos contra IL-17 humana y usos de los mismos

35 <130> 25345 WO

<150> EP08017155

<151> 2008-09-29

40 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

50 <400> 1

Asp Gly Asp Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

55 <213> Mus musculus

<400> 2

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

ES 2 493 042 T3

Val Lys Gly

<210> 3  
 <211> 10  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 3

10 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Thr Met Leu  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus

<400> 4

Leu Gln Tyr Asp Ala Phe Pro Pro Tyr  
 1 5

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Mus musculus

<400> 5

25 Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp  
 1 5

<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 30 <213> Mus musculus

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser  
 1 5 10

35 <210> 7  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

40 <400> 7

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

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

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

Ala Ile Ile Lys Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

ES 2 493 042 T3

85

90

95

Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110

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

<210> 8  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 8

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45

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

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

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

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

5 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 9

10

Val Ser Ile Ile Lys Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Tyr Tyr Pro Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Val Lys Gly

15 <210> 10  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 10

20

ES 2 493 042 T3

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

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

Thr Met Leu Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Asp Gly Asp Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr Trp  
 100 105 110

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

<210> 11

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

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

ES 2 493 042 T3

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

ES 2 493 042 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15

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

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo de unión a IL-17 humana, caracterizado por que el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 de SEC ID nº 1, una región CDR2 de secuencia SEC ID nº 2, y una región CDR1 de secuencia SEC ID nº 3, y porque el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 de secuencia SEC ID nº 4 y una región CDR2 de SEC ID nº 5 y una región CDR1.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que el anticuerpo inhibe a una concentración de 100 ng/ml de IL-17A de Cynomolgus la producción de IL-6 e IL-8 en un ensayo de liberación de citoquinas con un valor de IC<sub>50</sub> de 1,5 nM o inferior, utilizando fibroblastos dérmicos de Cynomolgus.
- 15 3. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que el dominio variable de cadena pesada comprende SEC ID nº 7 y el dominio variable de cadena ligera comprende SEC ID nº 8.
- 20 4. Anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que es de isotipo IgG1 humano modificado en la región bisagra en las posiciones aminoácidas 216 a 240 (numeración según el índice EU de Kabat) y/o en la segunda región interdominio en las posiciones aminoácidas 327 a 331 entre C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3.
- 25 5. Anticuerpo según la reivindicación 4, caracterizado por que comprende las mutaciones L234A (alanina en lugar de leucina en la posición aminoácida 234) y L235A (numeración según el índice EU de Kabat).
- 30 6. Composición farmacéutica, caracterizada por que comprende un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 7. Anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 5 para la utilización en el tratamiento de la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la soriasis, la enfermedad de Crohn, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el asma y el rechazo del trasplante.
- 40 8. Ácido nucleico codificante de una cadena pesada de un anticuerpo que se une a IL-17, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende una región CDR3 de cadena pesada de SEC ID nº 1, una región CDR2 de cadena pesada de SEC ID nº 2, una región CDR1 de cadena pesada de SEC ID nº 3, una región CDR3 de cadena ligera de SEC ID nº 4, una región CDR2 de cadena ligera de SEC ID nº 5 y una región CDR1 de cadena ligera de SEC ID nº 6.
9. Vector de expresión, caracterizado por que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 8, para la expresión de un anticuerpo que se une a IL-17 según la reivindicación 1 en una célula huésped procariótica o eucariótica.
10. Método para la producción de un anticuerpo recombinante de unión a IL-17, caracterizado por que expresa un ácido nucleico según la reivindicación 8 en una célula huésped procariótica o eucariótica y recuperar dicho anticuerpo a partir de dicha célula o del sobrenadante del cultivo celular.