

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 996**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 17/06** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2010 E 10779768 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2512511**

54 Título: **Anticuerpos humanizados contra IL-22RA humano**

30 Prioridad:

**19.11.2009 EP 09176525**

**20.11.2009 US 262998 P**

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

**23.03.2015**

73 Titular/es:

**MERCK SERONO S.A. (100.0%)**

**Centre Industriel  
1267 Coinsins, CH**

72 Inventor/es:

**BECKMANN, ROLAND y  
JOHNSON-LEGER, CAROLINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 531 996 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 humanizados contra IL-22RA humano

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados contra IL-22RA humano y a su uso en el tratamiento de la psoriasis y otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario tales como la artritis psoriásica y la dermatitis atópica.

**Antecedentes de la invención**

10 El IL-22RA (también conocido como IL22R, IL22R1, IL22RA1, CRF2-9 y Zcytor11) pertenece a la familia de receptores de citoquinas de tipo II y es un componente del receptor de IL-20, IL-22 e IL-24. Debido a su similitud estructural IL-20, IL-22 e IL-24, junto con IL-19 e IL-26, se combinaron con IL-10 en la denominada "familia de IL-10" (Kunz S et al. 2006). La IL-10 es un regulador maestro de la respuesta inmune que media la regulación a la baja de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en los macrófagos, las células T, y otras células del sistema inmunitario (Moore KW et al. 2001).

15 *In vitro*, la IL-20 y la IL-24 son producidas no sólo por las células inmunitarias activadas, sino también en un grado similar por los queratinocitos. *In vivo*, estas citoquinas son expresadas preferentemente en los tejidos inflamados. La IL-20 y la IL-24 pueden señalar a través de dos complejos receptores, IL-20RA/IL-20RB e IL-22RA/IL-20RB (Langer JA et al. 2004). Varios tejidos, concretamente la piel, los tejidos de los sistemas reproductor y respiratorio, y varias glándulas parecen ser las dianas principales de estos mediadores (Kunz S et al. 2006).

20 La IL-22 fue descubierta como un gen regulado al alza por Células T CD4<sup>+</sup> tras la activación, y comparte una identidad de secuencia de aminoácidos de 22% con la IL-10; por lo tanto, fue denominada originalmente factor inducible derivado de células T relacionado con IL-10 (IL-TIF) (Dumoutier L et al. 2000). A diferencia de IL-10, que regula las funciones células inmunitarias, la IL-22 controla las respuestas tisulares al sistema inmunitario. La IL-22 señala a través de un receptor heterodímérico formado por IL-22RA e IL-10RB que es altamente expresado en diversos tejidos pero no es detectable sobre las células inmunitarias. Inicialmente, la IL-22 se une a través de su sitio de unión a IL-22RA al dominio extracelular de IL-22RA y, con posterioridad, IL-10RB se une a una región creada por la interacción de IL-22 e IL-22RA para formar un complejo receptor de citoquina con una mayor afinidad por IL-22 (Li J et al. 2004). Puesto que IL-10RB es ampliamente expresado por muchos tipos de células diferentes, la expresión de IL-22RA es el componente limitante que determina la capacidad de respuesta a IL-22 de las células. IL-22RA se expresa fuertemente en el hígado, así como en la piel, los pulmones, el páncreas y otros tejidos periféricos (Wolk K et al. 2004; Aggarwal S et al. 2001).

El escrutinio exhaustivo de diferentes líneas celulares ha revelado que solo las células que expresan IL-22RA responden a IL-22, lo que sugiere que no existe un receptor alternativo que pueda mediar la señalización de IL-22.

35 Un receptor soluble denominado proteína de unión a IL-22 (IL-22BP, también conocida como IL22BP, IL22RA2, IL-22R-alfa2, CRF2X, CRF2-S1 y CRF2-10) también es capaz de unirse a IL-22 como una proteína natural antagonista y probablemente proporciona una regulación sistémica de la actividad de IL-22 (Kotenko SV et al. 2003). La IL-22 se ha encontrado en tejidos enfermos de pacientes con diferentes enfermedades inflamatorias crónicas que implican la infiltración de células T activadas, tales como la psoriasis, la artritis psoriásica y la dermatitis atópica. La IL-22 se ha descrito más comúnmente como una citoquina pro-inflamatoria debido a su expresión en las lesiones de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas y a su inducción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  (Wolk K et al. 2004; Andoh A et al. 2005; Ikeuchi H et al. 2005; Nogralas KE et al. 2009a; Nogralas KE et al. 2009b). Muy recientemente, Zheng et al. demostraron que IL-22 es importante para la mediación de la inflamación dérmica inducida por IL-23 en un modelo de ratón de psoriasis, indicando un papel pro-inflamatorio (Zheng Y et al. 2007). Teniendo en cuenta los efectos biológicos de IL-22, incluyendo la hiperplasia de queratinocitos, la inducción de quimioquinas y la producción de citoquinas pro-inflamatorias en ciertos tejidos, el uso de antagonistas que bloquean, inhiben, reducen o neutralizan la actividad de IL-22, p. ej., al interferir con la unión al receptor, puede impedir la infiltración de células patógenas en los sitios inflamatorios. Se han descrito previamente anticuerpos monoclonales anti-IL-22RA humano de ratón en las Solicitud de Patente PCT WO 2006/047249 presentada el 21 de Octubre de 2005. Sin embargo, los anticuerpos de ratón pueden causar inmunogenicidad y son deseables anticuerpos anti-IL-22RA humano humanizados. Los anticuerpos humanizados tienen generalmente al menos tres ventajas potenciales sobre los anticuerpos de ratón para su uso en terapia en seres humanos: (1) debido a que la porción efectora es humana, ésta puede interactuar mejor con las otras partes del sistema inmunitario humano (p. ej., destruir las células diana más eficazmente por medio de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)); (2) el sistema inmunitario humano no debería reconocer la región marco o constante del anticuerpo humanizado como foránea, y por lo tanto la respuesta de anticuerpos contra tal anticuerpo inyectado debe ser menor que contra un anticuerpo de ratón totalmente foráneo; y (3) se ha informado de que los anticuerpos de ratón inyectados tienen una vida media en la circulación humana mucho más corta que la vida media de los anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanizados inyectados tendrán presumiblemente una vida media más similar a la de los anticuerpos humanos de origen natural, permitiendo

administrar dosis más pequeñas y menos frecuentes. De este modo, en vista de lo anterior, existe una necesidad de anticuerpos anti-IL-22RA humano humanizados para el tratamiento de la inflamación mediada por IL-22, tal como psoriasis, artritis psoriásica y dermatitis atópica.

### Compendio de la invención

5 En un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une a IL-22RA humano. El anticuerpo humanizado de la invención comprende a) un dominio variable de cadena pesada que comprende H-CDR1, H-CDR2, y H-CDR3 que consisten en secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente, y b) dominio variable de cadena ligera que comprende L-CDR1, L-CDR2, y L-CDR3 que consisten en secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, o que consisten en secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 4, 5 y 7, respectivamente. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo descrito en la presente memoria, en donde a) dicho dominio variable de cadena pesada comprende regiones marco H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4 que consisten en secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11, respectivamente, y b) dicho dominio variable de cadena ligera comprende regiones marco L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4 que consisten en secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 12, 13, 14 y 15, respectivamente. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo descrito en la presente memoria, en donde a) dicho dominio variable de cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 16 y b) dicho dominio variable de cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 17. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo descrito en la presente memoria, en donde dicho anticuerpo comprende a) una región constante de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 18 y b) un dominio constante de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 19.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une a IL-22RA humano, que comprende una cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 21.

25 Se proporciona un polinucleótido, p. ej., un ADN, que codifica la cadena pesada del anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, dicho polinucleótido comprende o consiste en el SEQ ID NO: 22.

Se proporciona un polinucleótido, p. ej., un ADN, que codifica la cadena ligera del anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, dicho polinucleótido comprende o consiste en el SEQ ID NO: 23.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido, p. ej., un ADN, que codifica las cadenas tanto pesada como ligera del anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector, y más concretamente un vector de expresión que comprende a) un polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención y b) un polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un vector, y más concretamente un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención.

40 En otro aspecto, la invención proporciona una célula anfitriona, preferiblemente una célula CHO, que comprende, p. ej., como resultado de una transfección, un vector, y en particular un vector de expresión de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de un anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención, comprendiendo el método el cultivo de una célula anfitriona, preferiblemente una célula CHO, de acuerdo con la invención y el aislamiento del anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención para uso como un medicamento, en particular para uso en el tratamiento de la psoriasis, la artritis psoriásica o la dermatitis atópica.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención y su uso como medicamento, en particular para uso en el tratamiento de la psoriasis, la artritis psoriásica o la dermatitis atópica.

50 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención o de una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la psoriasis, la artritis psoriásica o la dermatitis atópica.

### Descripción de las figuras

La Figura 1 informa sobre el alineamiento entre el gen 4-1 del dominio variable kappa de la línea germinal de

inmunoglobulina humana (IGKV4-1) y VL 280.46.3.4 de ratón (280.46.3.4).

La Figura 2 informa sobre el alineamiento entre el gen 3-66 de la cadena pesada de la línea germinal de inmunoglobulina humana (IGHV3-66) y VH 280.46.3.4 de ratón (280.46.3.4).

5 La Figura 3 informa sobre el alineamiento entre el gen 4-1 del dominio variable kappa de la línea germinal de inmunoglobulina humana (IGKV4-1) y la primera versión de VL 280.46.3.4 humanizada (280.VK4-1-C).

La Figura 4 informa sobre el alineamiento entre la primera versión de VH 280.46.3.4 humanizada (280.VH3-66.1) y el gen 3-66 del dominio variable de la cadena pesada de la línea germinal de inmunoglobulina humana (IGHV3-66).

10 La Figura 5 informa sobre los resultados de una tinción con azul de Coomassie de anticuerpos 280.46.3.4 humanizados purificados con proteína A ejecutada sobre un gel SDS en condiciones no desnaturalizantes. Se utiliza aquí "humira" (adalimumab), un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  comercializado, como referencia patrón. "Marcador" es un marcador de peso molecular (PM) de proteína patrón con kD indicados en el lado izquierdo de la figura. "Antes" se refiere al anticuerpo 280.46.3.4 humanizado purificado con proteína A que comprende 280.VH3-66-1 emparejado con 280.VK4-1-C, que contiene por lo tanto una cisteína no emparejada en la cadena ligera. "Después" se refiere al anticuerpo 280.46.3.4 humanizado purificado con proteína A que comprende 280.VH3-66-1 emparejado con 280.VK4-1-S.

20 La Figura 6 informa sobre los resultados del análisis de fosforilación de STAT3 realizado en células de hepatoma HepG2 humano para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-1 emparejado con 280.VK4-1-S (■ 280.VH3-66-1/VK4-1-S), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado es 1,4 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, que contiene la cisteína libre, con valores de  $CI_{50}$  de 257,5 pM y 370,5 pM, respectivamente.

25 La Figura 7 informa sobre los resultados del análisis de proliferación realizado en células estables BaF3 transfectadas con el receptor de IL-22 humano para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-1 emparejado con 280.VK4-1-S (■ 280.VH3-66-1/VK4-1-S), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado es 1,7 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, que contiene la cisteína libre, con valores de  $CI_{50}$  de 340 pM y 587 pM, respectivamente.

30 La Figura 8 informa sobre los resultados del análisis de proliferación realizado en células estables BaF3 transfectadas con el receptor de IL-22 murino para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-1 emparejado con 280.VK4-1-S (■ 280.VH3-66-1/VK4-1-S), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado es 2,1 veces más potente que el anticuerpo parental del ratón, que contiene la cisteína libre, con valores de  $CI_{50}$  de 693 pM y 1.473 pM, respectivamente.

35 La Figura 9 informa sobre el alineamiento entre el gen 3-66 del dominio variable de cadena pesada de la línea germinal de inmunoglobulina humana (IGHV3-66) y la versión 4 de la VH 280.46.3.4 humanizada (280.VH3-66-4).

40 La Figura 10 informa sobre los resultados del análisis de fosforilación de STAT3 realizado en células de hepatoma HepG2 humano para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-4 emparejado con 280.VK4-1-T (◆ 280.VH3-66-4/VK4-1-T), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado es 1,8 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, con valores de  $CI_{50}$  de 183,2 pM y 333,0 pM, respectivamente.

45 La Figura 11 informa sobre los resultados del análisis de proliferación realizado en células estables BaF3 transfectadas con el receptor de IL-22 humano para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-4 emparejado con 280.VK4-1-T (◆ 280.VH3-66-4/VK4-1-T), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado es 1,75 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, con valores de  $CI_{50}$  de 334 pM y 587 pM, respectivamente.

50 La Figura 12 informa sobre los resultados del análisis de proliferación realizado en células estables BaF3 transfectadas con el receptor de IL-22 murino para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-4 emparejado con 280.VK4-1-T (◆ 280.VH3-66-4/VK4-1-T), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado es 2,1 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, con valores de  $CI_{50}$  de 687 pM y 1473 pM, respectivamente.

55 La Figura 13 informa sobre los resultados del análisis Biacore con el objetivo de medir la afinidad de unión a IL-22RA humano de un conjunto de mutantes, donde el Asp 32 de la H-CDR1 y el Asp 96 de la H-CDR3 se mutaron individualmente en 280.VH3-66-4. Estos mutantes individuales se emparejaron con el dominio variable de cadena ligera humanizada 280.VK4-1-T y, a continuación, se sometieron a ensayo para la medición de la afinidad. D32E:

mutación de Asp a Glu en la posición 32 en 280.VH3-66-4 para crear la versión 280.VH3-66-18; D32: versión parental 280.VH3-66-4; D32N: mutación de Asp a Asn en la posición 32 en 280.VH3-66-4; D96E: mutación de Asp a Glu en la posición 96 en 280.VH3-66-4; D96N: mutación de Asp a Asn en la posición 96 en 280.VH3-66-4.

5 Los resultados presentados en esta figura muestran que la mutación D32E aumentó la velocidad de asociación en aproximadamente 2 veces y disminuyó la velocidad de disociación en aproximadamente 5 veces en comparación con D32 no mutado parental (280.VH3-66-4). Por otra parte, la mutación D96E tuvo un impacto negativo, reduciendo la afinidad en aproximadamente 500 veces.

10 La Figura 14 informa sobre los resultados de una calorimetría de barrido diferencial (DSC) del mutante D32E y de D32 no mutado parental realizada para examinar su estabilidad térmica. El mutante D32E (línea de color gris claro) es más estable en 1 grado que el D32 parental (línea de color gris oscuro).

15 La Figura 15 informa sobre los resultados del análisis de fosforilación de STAT3 realizado en células de hepatoma HepG2 humano para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-18 emparejado con 280.VK4-1-T (◆ 280.VH3-66-18/VK4-1-T), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado es casi 3 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, con valores de  $CI_{50}$  de 132,5 pM y 370,5 pM, respectivamente.

La Figura 16 informa sobre el alineamiento entre la versión de VH humanizada final, 280.VH3-66-46, y el gen 3-66 del dominio variable de cadena pesada la línea germinal de inmunoglobulina humana (IGHV3-66).

La Figura 17 informa sobre el alineamiento entre el gen 4-1 del dominio variable kappa de la línea germinal de inmunoglobulina humana (IGKV4-1) y la versión de VL humanizada final, 280.VK4-1-TSY.

20 La Figura 18 informa sobre los resultados del análisis de fosforilación de STAT3 realizado en queratinocitos humanos normales para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-46 emparejado con 280.VK4-1-TSY (◆ 280.VH3-66-46/VK4-1-TSY), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado (280.346.TSY, véase el Ejemplo 7) es casi 9 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, con valores de  $CI_{50}$  de 60,95 pM y 541,9 pM, respectivamente.

25 La Figura 19 informa sobre los resultados del ensayo de fosforilación de STAT3 realizado en células de hepatoma HepG2 humano para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-46 emparejado con 280.VK4-1-TSY (◆ 280.VH3-66-46/VK4-1-TSY), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado (280.346.TSY, véase el Ejemplo 7) es casi 5 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, con valores de  $CI_{50}$  de 55,16 pM y 266,3 pM, respectivamente.

30 La Figura 20 informa sobre los resultados del análisis de proliferación realizado en células estables BaF3 transfectadas con el receptor de IL-22 humano para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-46 emparejado con 280.VK4-1-TSY (◆ 280.VH3-66-46/VK4-1-TSY), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado (280.346.TSY, véase el Ejemplo 7) es 1,7 vez más potente que el anticuerpo parental de ratón, con valores de  $CI_{50}$  de 317 pM y 545 pM, respectivamente.

35 La Figura 21 informa sobre los resultados del análisis de fosforilación de STAT3 realizado en células de hepatoma Hepa1-6 murino para calcular la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-46 emparejado con 280.VK4-1-TSY (● 280.VH3-66-46/VK4-1-TSY). Se utiliza una IgG1 humana como control negativo (■ hlgG1 de control). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado (280.346.TSY, véase el Ejemplo 7) es capaz de inhibir la actividad de IL-22 murina con una  $CI_{50}$  en el intervalo nanomolar (2,1 nM).

40 La Figura 22 informa sobre los resultados del análisis de proliferación realizado en células estables BAF3 transfectadas con el receptor de IL-22 murino para comparar la potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/kappa humana, que comprende 280.VH3-66-46 emparejado con 280.VK4-1-TSY (◆ 280.VH3-66-46/VK4-1-TSY), con el anticuerpo parental de ratón 280.46.3.4 (● 280.46.3.4). Los resultados muestran que el anticuerpo humanizado (280.346.TSY, véase el Ejemplo 7) es 6,2 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, con valores de  $CI_{50}$  de 137 pM y 849 pM, respectivamente.

45 La Figura 23 informa sobre los resultados de un ELISA competitivo realizado para medir la especificidad de 280.346.TSY para IL-22RA humano. Las placas de microtitulación se recubrieron con IL-22RA-ECD (es decir, IL-22RA-Dominio ExtraCelular). Se añadió anticuerpo 280-346-TSY biotinilado a la placa en presencia de competidores: receptor alfa de interleuquina 22 humano (hIL-22RA), proteína de unión a IL-22 humana (hIL-22BP), receptor alfa de IL-22 murino (MIL 22RA), receptor alfa de IL-10 humano (hIL-10R) y receptor alfa de IL-20 humano (hIL-20R). La unión a hIL-22RA aplicado como recubrimiento sobre las placas se revela mediante la adición de estreptavidina conjugada con peroxidasa. Los valores de  $CI_{50}$  medidos para IL22RA humano (● hIL-22RA) y murino

(◆ mL-22RA) son 18,25 pM y 149,3 pM respectivamente. 280.346.TSY no muestra reactividad cruzada con IL-22BP humana (■ hIL-22BP), IL-10R alfa (Δ hIL-10R) e IL-20R alfa (V hIL-20R).

La Figura 24 informa sobre los resultados de la actividad farmacodinámica de 280-346-TSY sobre amiloide A en suero inducido por IL-22 en ratones. Se administraron por vía subcutánea diferentes dosis de 280.346.TSY 22 horas antes de la inyección intravenosa de IL-22 murina recombinante. El control del vehículo es PBS administrado por vía subcutánea. La toma de muestras de sangre se realizó 6 horas después de la administración de IL-22. Se utiliza una IgG1 humana como control negativo (control de isotipo). El amiloide A sérico se determinó mediante ELISA. 280-346-TSY mostró eficacia en este modelo y proporcionó un valor de DE<sub>50</sub> de 0,5 mg/kg. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para realizar el análisis estadístico: \* p< 0,05 vs grupo de control de isotipo; \*\*\* p< 0,001 vs. grupo de control de isotipo.

La Figura 25 informa sobre los resultados de la actividad farmacodinámica de 280-346-TSY en un modelo de psoriasis en ratón. Se determinó la eficacia de 280-346-TSY en el engrosamiento del oído inducido por IL-23. Se inyectaron a los ratones 500 ng de IL-23 humana recombinante o PBS en días alternos durante 14 días. La cobertura terapéutica completa se realizó con diferentes dosis de 280.346.TSY administrado por vía subcutánea. El control del vehículo es PBS administrado por vía subcutánea. Se utiliza dexametasona (DEXA) como control positivo. El porcentaje de inhibición se calculó el día 9 que corresponde al pico de la hinchazón de la oreja. 280-346-TSY mostró eficacia en este modelo y proporcionó un valor de DE<sub>50</sub> de 1,8 mg/kg.

### Descripción detallada de la invención

Antes de exponer la invención en detalle, puede ser útil para la comprensión de la misma definir los siguientes términos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo", y su forma en plural "anticuerpos", incluyen, *entre otros*, anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales, nanocuerpos y fragmentos de unión a antígenos, tales como F(ab)<sub>2</sub>, fragmentos proteolíticos Fab y fragmentos de la región variable de la cadena sencilla (scFv). También están incluidos los anticuerpos o fragmentos intactos modificados mediante ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena sencilla y similares, así como péptidos y polipéptidos sintéticos de unión a antígenos. Los anticuerpos no humanos pueden ser humanizados injertando CDR no humanas sobre regiones marco y constantes humanas, o incorporando los dominios variables no humanos completos. En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar residuos no humanos dentro de las regiones marco humanas para potenciar las características de unión apropiadas. A través de la humanización de anticuerpos, se puede incrementar la vida media biológica y se reduce el potencial de reacciones inmunitarias adversas tras la administración a seres humanos.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "inmunoglobulina" (Ig) se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. Una cadena ligera tiene dos partes: el dominio variable (VL) y el dominio constante (CL), que en el contexto de una cadena ligera pueden ser denominados también región constante. Una cadena pesada también tiene dos partes: el dominio variable (VH) y la región constante (CH). En cada par, los dominios variables de la cadena ligera y pesada son todos responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina completas (aproximadamente 25 Kd) están codificadas por un gen del dominio variable en el extremo N (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen del dominio constante kappa o lambda (Ck y Cλ, respectivamente) en el extremo C. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina completas (aproximadamente 50 Kd), son codificadas de una manera similar por un gen del dominio variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante (aproximadamente 330 aminoácidos) mencionados a continuación. Existen cinco tipos de cadena pesada de mamífero indicados por las letras griegas: α, δ, ε, γ y μ. El tipo de cadena pesada define el isotipo del anticuerpo como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en los anticuerpos de diferentes isotipos. Las cadenas pesadas γ, α y δ tienen una región constante compuesta de tres dominios constantes de Ig (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, y C<sub>H3</sub>), y una región bisagra para una mayor flexibilidad; cadenas pesadas μ y ε tienen una región constante compuesta de cuatro dominios constantes de Ig (C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>, y C<sub>H4</sub>) y una región bisagra.

Un dominio variable de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina consiste en una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables. De este modo, el término "región hipervariable" se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácidos de una "Región Determinante de la Complementariedad" o "CDR", es decir, L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 en el dominio variable de cadena ligera y H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 en el dominio variable de cadena pesada (Kabat et al. 1991) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (Chothia y Lesk, 1987). Los residuos de la "Región Marco" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región

hipervariable según se define en la presente memoria. Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras (es decir, L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4) o pesadas (es decir, H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4) están relativamente conservadas dentro de una especie. De este modo, una "región marco humana" es una región marco que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85% o más, normalmente 90-95% o más) a la región marco de una inmunoglobulina humana de origen natural. La región marco de un anticuerpo, esto es las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constitutivas, sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno.

Por consiguiente, 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 (normalmente un ratón o una rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se denomina "donadora" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco que se denomina "aceptora". No es necesario que estén presentes regiones constantes, pero si las hubiera, deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, idénticas en al menos aproximadamente 85-90%, preferiblemente en aproximadamente 95% o más. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR y algunos residuos de la región constante de cadena pesada si se necesita la modulación de las funciones efectoras, son sustancialmente idénticas a las correspondiente partes de las secuencias de inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera humanizada y un dominio variable de cadena pesada humanizada. En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar residuos no humanos dentro de las regiones marco humanas para potenciar las características de unión apropiadas y/o se pueden introducir algunas mutaciones de aminoácidos dentro de las CDR con el fin de mejorar la afinidad de unión y/o reducir la inmunogenicidad y/o aumentar el grado de humanidad.

El término "anticuerpos recombinantes" significa anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos ha sido variada a partir de la de un anticuerpo nativo. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, no es necesario limitarse a las secuencias de aminoácidos encontradas en los anticuerpos naturales; los anticuerpos se pueden rediseñar para obtener las características deseadas. Las variaciones posibles son muchas y varían desde el cambio de sólo uno o unos pocos aminoácidos al rediseño completo de, por ejemplo, el dominio variable o la región constante. Los cambios en la región constante se realizarán, en general, con el fin de mejorar, reducir o alterar características, tales como la fijación del complemento (p. ej., citotoxicidad dependiente del complemento, CDC), la interacción con membranas y otras funciones efectoras (p. ej., la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, CCDA). Los cambios en el dominio variable se realizarán con el fin de mejorar las características de unión al antígeno.

Además de los anticuerpos, pueden existir inmunoglobulinas en una variedad de otras formas incluyendo, por ejemplo, de cadena sencilla o Fv, Fab y (Fab')<sub>2</sub>, así como diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos híbridos multivalentes o multispecíficos. Según se utiliza en la presente memoria, los términos "Fv de cadena sencilla", "anticuerpos de cadena sencilla", "Fv" o "scFv" se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras, pero carece de las regiones constantes, pero dentro de una única cadena polipeptídica. Generalmente, un anticuerpo de cadena sencilla comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que le permite formar la estructura deseada que permitiría la unión al antígeno. En realizaciones específicas, los anticuerpos de cadena sencilla también pueden ser bi-específicos y/o humanizados. Un "fragmento Fab" consiste en una cadena ligera y los dominios variable y C<sub>H</sub>1 de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada. Un "fragmento Fab" contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios C<sub>H</sub>1 y C<sub>H</sub>2, de tal manera que se puede formar un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')<sub>2</sub>. Un "F(ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C<sub>H</sub>1 y C<sub>H</sub>2, de manera que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas. Después de haber definido algunos términos importantes, ahora es posible centrar la atención en realizaciones concretas de la presente invención.

La presente invención se basa en el descubrimiento de anticuerpos anti-IL-22RA humano humanizados. El uso de estos anticuerpos como antagonistas de IL-22RA puede inhibir la inflamación y, por lo tanto, puede ser útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas que implican la infiltración de células T activadas, tales como la psoriasis, la artritis psoriásica y la dermatitis atópica. La invención proporciona el uso de anticuerpos humanizados que reconocen, se unen, modulan y/o neutralizan el IL-22RA. En particular, la invención proporciona el uso de dominios variables de cadena ligera y pesada humanizadas y que reconocen, se unen, modulan y/o neutralizan el IL-22RA. Tales dominios variables de cadena ligera y pesada humanizadas se pueden fusionar, respectivamente, a un dominio constante kappa o lambda y a una región constante de una cadena pesada seleccionada entre cualquier isotipo (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), y expresar en una variedad de células anfitrionas. Preferiblemente, la región constante seleccionada es la de una IgG, y más preferiblemente de una IgG1. Los anticuerpos anti-IL-22RA humanizados descritos en la presente memoria se generaron utilizando, como punto de partida del proceso de humanización, secuencias de aminoácidos de anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-22RA humano descritos previamente en la solicitud de patente PCT WO 2006/047249 presentada el 21 de Octubre de 2005. IL-22RA es un receptor de citoquinas de tipo II descrito, por primera vez, como Zcytor11, en la solicitud de patente PCT WO 99/07848 presentada el 30 de Julio de 1998. La secuencia de aminoácidos de IL-22RA humano se muestra en el SEQ ID NO: 24.

La presente invención también proporciona anticuerpos contra IL-22RA humanizados que se unen a fragmentos de polipéptidos o péptidos que comprenden una porción portadora de epítipo de un polipéptido IL-22RA o un epítipo inmunogénico o epítipo antigénico. La unión de los anticuerpos a estos epítopos da como resultado la inhibición, bloqueo, neutralización, y/o reducción en la transducción de la señal de IL-22RA.

- 5 La actividad de los anticuerpos descritos en la presente memoria se puede medir por su capacidad para inhibir o reducir la proliferación utilizando una variedad de análisis que miden la proliferación de y/o la unión a células que expresan el receptor IL-22RA. Tienen particular interés los cambios en las células dependientes de IL-22. Las líneas celulares adecuadas que se van a diseñar para que sean dependientes de IL-22 incluyen la línea celular BaF3. La actividad de los anticuerpos anti-IL-22RA humanizados también se puede medir en el análisis de proliferación de  
10 BaF3, el análisis de fosforilación de STAT3 en células de hepatoma HepG2 humano o en células de hepatoma Hepa1-6 de ratón, el análisis Biacore, o el análisis de queratinocitos humanos normales descrito más adelante.

En una realización, el anticuerpo humanizado de la invención comprende a) un dominio variable de cadena pesada que comprende H-CDR1, H-CDR2, y H-CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente y b) un dominio variable de cadena ligera que comprende L-CDR1, L-CDR2, y L-CDR3 que  
15 consisten en las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, o que consisten en las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 4, 5 y 7, respectivamente.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo descrito en la presente memoria, en donde a) dicho dominio variable de cadena pesada comprende las regiones marco H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4 que consisten en las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11, respectivamente, y b) dicho dominio variable de  
20 cadena ligera comprende las regiones marco L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4 que consisten en las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 12, 13, 14 y 15, respectivamente.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo descrito en la presente memoria, en donde a) dicho dominio variable de cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 16 y b) dicho dominio variable de cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 17.

- 25 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo descrito en la presente memoria, en donde a) dicho dominio variable de cadena pesada se fusiona a una región constante de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la región constante de una IgA, IgG, IgM, IgD, IgE o cualquier subclase humanas, preferiblemente una IgG1 y b) dicho dominio variable de cadena ligera se fusiona a un dominio constante de una cadena ligera de inmunoglobulina humana  $\kappa$  o  $\lambda$ , preferiblemente  $\kappa$ .

- 30 En otra realización, dicha región constante de cadena pesada comprende algunas mutaciones de aminoácidos que modulan, reducen o inhiben la función efectora del anticuerpo (p. ej., toxicidad celular dependiente anticuerpo (CCDA) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)).

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo descrito en la presente memoria, en donde dicho anticuerpo comprende a) una región constante de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos del  
35 SEQ ID NO: 18 y b) un dominio constante de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 19.

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une a IL-22RA humano, que comprende una cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 21.

- 40 Los métodos para preparar los polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en la presente memoria (incluyendo ADN y ARN) son bien conocidos en la técnica. El ARN total se puede preparar utilizando la extracción con isotiocianato de guanidinio seguido de aislamiento mediante centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin JM et al. 1979). El ARN poli (A)+ se prepara a partir del ARN total utilizando el método de Aviv y Leder (Aviv H et al. 1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir de ARN poli (A)+ utilizando métodos conocidos. Como  
45 alternativa, se puede aislar el ADN genómico. Los polinucleótidos que codifican los anticuerpos IL-22RA son identificados y aislados a continuación, por ejemplo, mediante hibridación o PCR.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden producirse mediante cualquier mecanismo conocido en la técnica, tal como mediante tecnologías recombinantes, síntesis química, clonación, ligaciones, o combinaciones de las mismas. En una realización, los anticuerpos de la presente invención se producen mediante tecnologías recombinantes, p. ej., mediante expresión de un ácido nucleico correspondiente en una célula anfitriona adecuada. El polipéptido producido puede estar glicosilado o no, o puede contener otras modificaciones post-traduccionales, dependiendo del tipo de célula anfitriona utilizada. Muchos libros y revistas proporcionan enseñanzas sobre cómo clonar y producir proteínas recombinantes utilizando vectores y células anfitrionas procariotas o eucariotas.

Por lo tanto, una realización adicional de la presente invención es una molécula de ácido nucleico aislada que  
55 codifica cualquiera de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos anteriormente o posteriormente, o una hebra complementaria o una secuencia degenerada de la misma. En este sentido, el término "molécula de ácido nucleico" abarca todos los diferentes tipos de ácidos nucleicos, incluyendo sin limitación ácidos desoxirribonucleicos

(p. ej., ADN, ADNc, ADNg, ADN sintético, etc.), ácidos ribonucleicos (p. ej., ARN) y ácidos peptidonucleicos (PNA). En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN, tal como una molécula de ADN de doble hebra o una molécula de ADNc. El término "aislado" significa moléculas de ácido nucleico que se han identificadas y separadas de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en la fuente natural. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o configuración diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica, tal como existe en las células naturales. Una secuencia degenerada designa cualquier secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos como una secuencia de nucleótidos de referencia, pero que comprende una secuencia de nucleótidos distinta como resultado de la degeneración del código genético.

En otra realización, una molécula de ácido nucleico, también denominada polinucleótido, codifica la cadena pesada del anticuerpo humanizado de la invención y otro polinucleótido codifica la cadena ligera del anticuerpo humanizado de la invención.

En una realización preferida, el polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo humanizado de la invención comprende o consiste en el SEQ ID NO: 22.

En una realización preferida, el polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo humanizado de la invención comprende o consiste en el SEQ ID NO: 23.

En una realización preferida, un polinucleótido único codifica la cadena tanto pesada como ligera del anticuerpo humanizado de la invención.

Una realización adicional de esta invención es un vector que comprende ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos anterior o posteriormente. El vector puede ser cualquier vector de clonación o expresión, integrativo o de replicación autónoma, funcional en cualquier célula procariota o eucariota. En particular, el vector puede ser un plásmido, cósmido, virus, fago, episoma, cromosoma artificial, y similares. El vector puede comprender las secuencias que codifican tanto la cadena pesada y ligera, o cualquiera de las secuencias codificantes de la cadena ligera o pesada. Si el vector comprende secuencias codificantes para las cadenas tanto pesada como ligera, las cadenas pesada y ligera pueden estar cada una conectadas operablemente a un promotor. El promotor puede ser el mismo o diferente para las cadenas pesada y ligera. Las cadenas pesada y ligera también pueden estar conectadas operablemente a un único promotor, en este caso las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden estar separadas preferiblemente por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Los promotores adecuados para la expresión de genes eucariotas son, por ejemplo, promotores derivados de genes virales tales como el citomegalovirus murino o humano (CMV), el promotor de CMV bi-direccional de ratón o el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), que son bien conocidos por el experto en la técnica. El vector puede comprender elementos reguladores, tales como un promotor, terminador, potenciador, marcador de selección, origen de replicación, aislador etc. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o varios sitios para endonucleasas de restricción apropiadas utilizando mecanismos conocidos en la técnica. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea mecanismos de ligación convencionales que son conocidos por el experto en la técnica.

Una realización adicional de la presente invención es una célula anfitriona recombinante, en donde dicha célula comprende una molécula de ácido nucleico/polinucleótido o un vector como se ha definido anteriormente. La célula anfitriona puede ser una célula procariota o eucariota. Los ejemplos de las células procariotas incluyen bacterias, tales como *E.coli*. Los ejemplos de las células eucariotas son células de levadura, células vegetales, células de mamíferos y células de insectos incluyendo cualquier cultivo celular primario o una línea celular establecida (p. ej., 3T3, Vera, HEK293, TN5, etc.). Las células anfitrionas adecuadas para la expresión de proteínas glicosiladas derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de líneas celulares anfitrionas de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Las células de mamífero particularmente preferidas de la presente invención son las células CHO.

Según se ha descrito aquí anteriormente, los anticuerpos de la presente invención se pueden producir mediante cualquier mecanismo conocido en la técnica, tal como mediante tecnologías recombinantes, síntesis química, clonación, ligaciones, o combinaciones de las mismas.

Por lo tanto, otra realización de esta invención es un método de producción de un anticuerpo de la presente invención, comprendiendo el método cultivar una célula anfitriona recombinante de la invención bajo condiciones que permitan la expresión de la molécula de ácido nucleico, y recuperar/aislar el polipéptido producido. El polipéptido producido pueden estar glicosilado o no, o puede contener otras modificaciones post-traduccionales, dependiendo del tipo de célula anfitriona utilizado. El método de producción de un anticuerpo de la presente invención puede comprender adicionalmente la etapa de formulación del anticuerpo en una composición farmacéutica.

Por lo tanto, una realización adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica puede

comprender adicionalmente otros excipientes, tales como tampones, estabilizadores, tensioactivos, etc. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son útiles en el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento (local o sistémico) de la psoriasis y otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario tales como la artritis psoriásica y la dermatitis atópica.

- 5 El término "tratamiento" en el contexto de esta invención se refiere a cualquier efecto beneficioso sobre la progresión de la enfermedad, incluyendo la atenuación, reducción, descenso o disminución del desarrollo patológico después de la aparición de la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 El término "farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquier vehículo, que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el anfitrión al que se administra. Por ejemplo, para la administración parenteral, la proteína o proteínas activas se pueden formular en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina de suero y solución de Ringer.

- 15 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad en un paciente, que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la enfermedad se selecciona de entre la psoriasis, la artritis psoriásica y la dermatitis atópica.

- 20 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad en un paciente, que comprende administrar al paciente un anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la enfermedad se selecciona de entre la psoriasis, la artritis psoriásica y la dermatitis atópica.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso del anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la psoriasis, la artritis psoriásica o la dermatitis atópica.

- 25 Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra pulmonarmente.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra intranasalmente.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra por inhalación.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra oralmente.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra intravenosamente o intramuscularmente.

- 30 Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra subcutáneamente.

Una composición farmacéutica se administra de acuerdo con una cualquiera de las rutas descritas anteriormente diariamente o en días alternos.

- 35 Para la administración parenteral (p. ej. intravenosa, subcutánea, intramuscular), una composición farmacéutica de la invención se puede formular en forma de solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado asociada con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (p. ej., agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (p. ej., manitol) o la estabilidad química (p. ej., conservantes y tampones). La formulación se esteriliza mediante técnicas usadas comúnmente.

- 40 Los ingredientes activos de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención se pueden administrar a un individuo de diferentes maneras. Las rutas de administración pueden incluir las rutas intradérmica, transdérmica (p. ej. en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, epidural, tópica, oral y mediante administración en aerosol, ruta intranasal o mediante inhalación. Se puede utilizar cualquier otra ruta de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante terapia génica en donde una molécula de ADN que codifica el agente activo se administra al paciente (p. ej., a través de un vector), que hace que el agente activo sea expresado y secretado *in vivo*. Además, una  
45 composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 50 La dosificación administrada a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, la ruta de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), el grado de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir, formular, administrar o utilizar en otras formas

alternativas que pueden ser preferidas de acuerdo con el método de uso y/o producción deseado. También se pueden generar productos conjugados o complejos útiles para mejorar los agentes en términos de eficacia de liberación del fármacos. Para este fin, los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden estar en la forma de productos conjugados activos o complejos con moléculas tales como polietilenglicol y otros polímeros naturales o sintéticos (Harris JM et al., 2003). Con respecto a esto, la presente invención contempla anticuerpos modificados químicamente, en los que el anticuerpo está conectado a un polímero. Típicamente, el polímero es soluble en agua, de manera que el producto conjugado no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Por otra parte, se puede utilizar una mezcla de polímeros para producir los productos conjugados. Los productos conjugados utilizados para la terapia pueden comprender radicales poliméricos solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG, ariloxi-PEG, bis-succinimidilcarbonato de PEG, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (p. ej., glicerol), poli(alcohol vinílico), dextrano, celulosa, u otros polímeros basados en carbohidratos. El PEG adecuado puede tener un peso molecular de aproximadamente 600 a aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un producto conjugado también puede comprender una mezcla de tales polímeros solubles en agua. Los ejemplos de los productos conjugados comprenden cualquiera de los anticuerpos descritos aquí anteriormente y un radical de óxido de polialquilo unido al extremo N. El PEG es un óxido de polialquilo adecuado. Como ilustración, cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria se puede modificar con PEG, un proceso conocido como "PEGilación". La PEGilación se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica (Francis GE et al. 1998). Por ejemplo, la PEGilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. Preferiblemente, todas estas modificaciones no afectan significativamente a la capacidad del anticuerpo para unirse a IL-22RA humano.

También se incluyen anticuerpos humanizados modificados que proporcionan una estabilidad y/o una eficacia terapéutica mejoradas. Los ejemplos de los anticuerpos modificados incluyen aquellos con sustituciones conservativas de residuos de aminoácidos, y una o más delecciones o adiciones de aminoácidos que no alteran perjudicialmente de manera significativa la utilidad de unión al antígeno. Las sustituciones pueden variar de cambiar o modificar uno o más residuos de aminoácidos al rediseño completo de una región, siempre y cuando se mantenga la utilidad terapéutica. Los anticuerpos humanizados de la presente invención se pueden modificar post-traduccionalmente (p. ej., acetilación, y fosforilación) o se pueden modificar sintéticamente (p. ej., anclaje de un grupo marcador). Se entiende que los anticuerpos humanizados diseñados mediante el presente método pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas adicionales que no tengan sustancialmente ningún efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina.

Los anticuerpos humanizados pueden incluir derivados que están modificados, por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados incluyen anticuerpos humanizados, que han sido modificados, p. ej., mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización por medio de grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos y/o no naturales. La vidas medias *in vivo* de los anticuerpos humanizados de la presente invención se puede aumentar mediante la modificación (p. ej., sustitución, delección o adición) de residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre la región Fc y el receptor FcRn.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Selección del anticuerpo de partida para el procedimiento de humanización

Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-22RA humano expresadas por los cinco hibridomas descritos en el Ejemplo 18 de la solicitud de patente PCT WO 2006/047249 presentada el 21 de Octubre de 2005 se compararon con el fin de seleccionar el que se iba a utilizar como punto de partida del proceso de humanización. Los criterios más importantes para la selección fueron: alta afinidad por IL-22RA humano, reactividad cruzada con IL-22RA murino, sin reactividad cruzada con IL-22BP y sin actividad agonística para IL-22RA humano. Solo un anticuerpo cumplió todos los criterios anteriores (datos no mostrados), es decir, el anticuerpo expresado por el hibridoma denominado 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes ATCC PTA-6284) que es un anticuerpo IgG1/kappa de ratón.

La secuencia de aminoácidos específica del dominio variable de las cadenas pesada y ligera (VH y VL, respectivamente) de este anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-22RA humano (denominado en lo sucesivo "280.46.3.4 de ratón") se citan en los SEQ ID NO: 25 y 26, respectivamente.

Ejemplo 2: Diseño de dominios variables de 280.46.3.4 humanizado reordenado

A. Selección de la línea germinal humana homóloga para la secuencia marco

Utilizando la base de datos IMGT-GENE (Giudicelli V. et al. 2005) los dominios variables de cadena ligera kappa de la línea germinal humana cuyas secuencias globales (marcos y CDR) mostraron un elevado porcentaje de identidad con las de VL 280.46.3.4 de ratón se identificaron por comparación de las secuencias de aminoácidos. La VL

280.46.3.4 de ratón fue la más homóloga con el gen 4-1 del dominio variable kappa de la línea germinal de inmunoglobulina humana (IGKV4-1) mostrando una identidad de 82,2% (83 residuos de aminoácidos de 101; Figura 1). Por lo tanto se seleccionó IGKV4-1, enumerado en el SEQ ID NO: 27 como secuencia aceptora marco humana para el injerto de CDR. Para la VH 280.46.3.4 de ratón, no se identificó un elevado porcentaje con la línea germinal humana utilizando la base de datos IMGT-GENE. El gen 1-46 del dominio variable de cadena pesada de la línea germinal de inmunoglobulina humana (IGHV1-46) fue identificado por tener la mayor homología con una identidad de 60,2% (59 residuos de aminoácidos de 98). Sin embargo, IGHV3-66, enumerado en el SEQ ID NO: 28, fue seleccionado eficazmente como secuencia aceptora marco humana a pesar de su mínimo nivel de homología (identidad de 50,0%, 49 residuos de aminoácidos de 98; Figura 2) puesto que su secuencia es parecida a la de VH de 280.46.3.4 de ratón en varias posiciones marco importantes y es por lo tanto probable que ofrezca una buena estabilidad.

B. Las sustituciones de aminoácidos en regiones marco

B.1 Cadena ligera

La siguiente etapa en el diseño para la VL 280.46.3.4 humanizada fue unir las CDR de la VL de 280.46.3.4 de ratón con las regiones marco (FR) de IGKV4-1 de la línea germinal humana. Se utilizó el gen de la línea germinal humana de inmunoglobulina kappa de unión 1 (IGKJ1) en lugar del gen J de ratón. En la primera versión de la VL de 280.46.3.4 humanizado reordenado (280.VK4-1-C), enumerado en el SEQ ID NO: 29, no se realizaron cambios en las FR humanas, es decir, se pensó que ninguno de los residuos de ratón de las FR fuera estructuralmente importante. El alineamiento entre IGKV4-1 y la primera versión de VL de 280.46.3.4 humanizado (280.VK4-1-C) se muestra en la Figura 3.

B.2 Cadena pesada

La siguiente etapa en el proceso de diseño para la VH 280.46.3.4 humanizada fue unir las CDR de la VH de 280.46.3.4 de ratón a las FR de la línea germinal humana IGHV3-66. En la primera versión de la VH de 280.46.3.4 humanizado reordenado (280.VH3-66.1), enumerada en el SEQ ID NO: 30, se realizaron 12 cambios en las regiones marco humanas (Figura 4). Los 12 cambios en las FR humanas fueron en las posiciones 27, 28, 29, 30, 48, 49, 67, 69, 70, 71, 73 y 78 (véase la numeración en Tabla 1).

Tabla 1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que conduce al diseño de VH 280.46.3.4 humanizado. La primera columna (numeración de Kabat) proporciona el número de residuo de acuerdo con Kabat (Kabat et al. 1991). FR y CDR identifican las regiones marco (H-FR1, H-FR2, H-FR3, y H-FR4) y las regiones determinantes de la complementariedad (H-CDR1, H-CDR2, y H-CDR3) del dominio variable de cadena pesada, separando las tres CDR las cuatro FR. La segunda columna (numeración de Chothia) proporciona el número de residuo de acuerdo con la definición de las CDR de Chothia (Al-Lazikani et al. 1997). La tercera columna (VH de 280.46.3.4 ratón) proporciona la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada 280.46.3.4 de ratón. La cuarta columna (IGHV3-66) proporciona la secuencia de aminoácidos del gen 3-66 del dominio Variable de cadena Pesada de la línea germinal de inmunoglobulina humana (número de acceso IMGT X92218) utilizada como marco aceptor humano para el injerto de CDR. La quinta columna (280.VH3-66-46 humanizado) proporciona la secuencia de aminoácidos de la versión humanizada final de VH de 280.46.3.4 de ratón; los residuos subrayados indican los aminoácidos que difieren de IGHV3-66 de la línea germinal humana.

Numeración de Kabat	Numeración de Chothia	VH 280.46.3.4 de ratón	IGHV3-66	280.VH3-66-46 humanizado
(H-FR1) 1	1	E	E	E
2	2	V	V	V
3	3	Q	Q	Q
4	4	L	L	L
5	5	Q	V	V
6	6	Q	E	E
7	7	S	S	S
8	8	G	G	G
9	9	P	G	G

ES 2 531 996 T3

Numeración de Kabat	Numeración de Chothia	VH 280.46.3.4 de ratón	IGHV3-66	280.VH3-66-46 humanizado
10	10	E	G	G
11	11	L	L	L
12	12	V	V	V
13	13	R	Q	Q
14	14	P	P	P
15	15	G	G	G
16	16	T	G	G
17	17	S	S	S
18	18	V	L	L
19	19	K	R	R
20	20	I	L	L
21	21	S	S	S
22	22	C	C	C
23	23	K	A	A
24	24	A	A	A
25	25	S	S	S
26	<b>(H-CDR1) 26</b>	G	G	G
27	<b>27</b>	Y	F	<u>Y</u>
28	<b>28</b>	S	T	<u>S</u>
29	<b>29</b>	L	V	I
(H-FR1) 30	<b>30</b>	T	S	<u>I</u>
<b>(H-CDR1) 31</b>	<b>31</b>	A	S	<u>A</u>
<b>32</b>	<b>(H-CDR1) 32</b>	D	N	<u>E</u>
<b>33</b>	33	Y	Y	Y
<b>34</b>	34	M	M	M
<b>(H-CDR1) 35</b>	35	N	S	<u>N</u>
(H-FR2) 36	36	W	W	W
37	37	V	V	V
38	38	K	R	R
39	39	Q	Q	Q
40	40	S	A	A
41	41	P	P	P

ES 2 531 996 T3

Numeración de Kabat	Numeración de Chothia	VH 280.46.3.4 de ratón	IGHV3-66	280.VH3-66-46 humanizado
42	42	E	G	G
43	43	E	K	K
44	44	S	G	G
45	45	L	L	L
46	46	E	E	E
47	47	W	W	W
48	48	I	V	I
(H-FR2) 49	49	G	S	<u>G</u>
(H-CDR2) 50	50	E	V	<u>E</u>
51	51	I	I	I
52	(H-CDR2) 52	N	Y	<u>N</u>
52A	52A	P	-	<u>P</u>
53	53	S	S	S
54	54	T	G	<u>I</u>
55	55	G	G	G
56	(H-CDR2) 56	T	S	<u>I</u>
57	57	T	T	T
58	58	T	Y	<u>I</u>
59	59	Y	Y	Y
60	60	N	A	<u>N</u>
61	61	Q	D	<u>Q</u>
62	62	K	S	<u>K</u>
63	63	F	V	<u>F</u>
64	64	E	K	K
(H-CDR2) 65	65	A	G	G
(H-FR3) 66	66	K	R	R
67	67	A	F	F
68	68	T	T	T
69	69	L	I	I
70	70	T	S	S
71	71	V	R	<u>V</u>
72	72	D	D	D

ES 2 531 996 T3

Numeración de Kabat	Numeración de Chothia	VH 280.46.3.4 de ratón	IGHV3-66	280.VH3-66-46 humanizado
73	73	Q	N	<u>Q</u>
74	74	S	S	S
75	75	S	K	K
76	76	N	N	N
77	77	T	T	T
78	78	A	L	<u>A</u>
79	79	Y	Y	Y
80	80	L	L	L
81	81	Q	Q	Q
82	82	L	M	M
82A	82A	T	N	N
82B	82B	S	S	S
82C	82C	L	L	L
83	83	T	R	R
84	84	S	A	A
85	85	E	E	E
86	86	D	D	D
87	87	S	T	T
88	88	A	A	A
89	89	V	V	V
90	90	Y	Y	Y
91	91	Y	Y	Y
92	92	C	C	C
93	93	A	A	A
(H-FR3) 94	94	R	R	R
<b>(H-CDR3) 95</b>	<b>(H-CDR3) 95</b>	F		F
<b>96</b>	<b>96</b>	D		D
<b>97</b>	<b>97</b>	A		A
<b>98</b>	<b>98</b>	Y		Y
<b>99</b>	<b>99</b>			F
<b>100</b>	<b>100</b>	F	F	-
<b>101</b>	<b>101</b>	D	D	D

Numeración de Kabat	Numeración de Chothia	VH 280.46.3.4 de ratón	IGHV3-66	280.VH3-66-46 humanizado
(H-CDR3) 102	(H-CDR3) 102	Y	Y	Y
(H-FR4) 103	103	W	W	W
104	104	G	G	G
105	105	Q	Q	Q
106	106	G	G	G
107	107	T	T	T
108	108	T	L	L
109	109	V	V	V
110	110	T	T	T
111	111	V	V	V
112	112	S	S	S
(H-FR4) 113	113	S	S	S

5 En la posición 27, 28, 29 y 30 en H-FR1, los aminoácidos presentes en IGHV3-66 de la línea germinal humana se cambiaron a los aminoácidos encontrados en esas posiciones en VH de 280.46.3.4 de ratón. Aunque estas posiciones se designan por estar dentro de H-FR1 (numeración de Kabat; Tabla 1), las posiciones 26 a 30 son parte del bucle estructural que forma el bucle H-CDR1 de la VH. Es probable por lo tanto que los aminoácidos de estas posiciones estén implicados directamente en la unión al antígeno. De hecho, las posiciones 27 a 30 son parte de la estructura canónica para H-CDR1 tal como define Chothia (Tabla 1).

10 En las posiciones 48 y 49 en H-FR2, los aminoácidos presentes en IGHV3-66 de la línea germinal humana (valina y serina, respectivamente) se cambiaron a los aminoácidos encontrados en esas posiciones en VH de 280.46.3.4 de ratón (isoleucina y glicina, respectivamente; Tabla 1). Estos dos residuos están muy cerca de la H-CDR2 e influyen en la estructura fina del bucle de CDR.

15 En las posiciones 67, 69, 70, 73 y 78 en H-FR3, los aminoácidos presentes en IGHV3.66 de la línea germinal humana (fenilalanina, isoleucina, serina, asparragina y leucina, respectivamente) se cambiaron a los aminoácidos encontrados en esas posiciones en la VH de 280.46.3.4 de ratón (alanina, leucina, treonina, glutamina y alanina, respectivamente; Tabla 1). Estos 5 residuos son importantes en el empaquetamiento de los dominios VL y VH y muy probablemente influyen en la estabilidad global del anticuerpo.

20 En la posición 71 en H-FR3, la arginina presente en IGHV3-66 de la línea germinal humana se cambió a una valina encontrada en esa posición en la VH de 280.46.3.4 de ratón. La posición 71 es parte de la estructura canónica para H-CDR2 tal como define Chothia (Tabla 1). La sustitución de una arginina por una valina en esta posición perturbaría muy probablemente la colocación del bucle de H-CDR2.

Ejemplo 3: Extracción de cisteína libre en la CDR1 de la cadena ligera

25 Existe una cisteína no emparejada en el CDR1 de la cadena ligera (L-CDR1) en la posición 32 de Kabat (véase la numeración en la Tabla 2) que se ha asociado con un alto nivel de formación de agregados covalentes durante la expresión y la purificación del anticuerpo 280.46.3.4 humanizado que comprende 280.VH3-66-1 emparejado con 280.VK4-1-C (datos no mostrados).

30 Tabla 2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos que conduce al diseño de VL de 280.46.3.4 humanizado. La primera columna (numeración de Kabat y Chothia) proporciona el número de residuo de acuerdo con Kabat (Kabat et al. 1991) y Chothia (Al-Lazikani et al. 1997). FR y CDR identifican las regiones marco (L-FR1, L-FR2, L-FR3, y L-FR4) y las regiones determinantes de complementariedad (L-CDR1, L-CDR2, y L-CDR3) del dominio variable de cadena ligera, separando las tres CDR las cuatro FR. La segunda columna (VL de 280.46.3.4 de ratón) proporciona la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de 280.46.3.4 de ratón. La tercera columna (IGKV4-1) proporciona la secuencia de aminoácidos del gen 4-1 del dominio variable kappa de la línea germinal de inmunoglobulina humana (número de acceso IMGT Z00023) utilizada como marco aceptor humano para

ES 2 531 996 T3

el injerto de CDR. La cuarta columna (280.VK4-1-TSY Humanizado) proporciona la secuencia de aminoácidos de la versión humanizada optimizada final de VL de 280.46.3.4 de ratón; los residuos subrayados indican los aminoácidos que difieren de IGKV4-1 la línea germinal humana.

Numeración de Kabat y Chothia	VL de 280.46.3.4 de ratón	IGKV4-1	280.VK4-1-TSY Humanizado
(L-FR1) 1	D	D	D
2	I	I	I
3	V	V	V
4	M	M	M
5	T	T	T
6	Q	Q	Q
7	S	S	S
8	P	P	P
9	S	D	D
10	S	S	S
11	L	L	L
12	A	A	A
13	V	V	V
14	S	S	S
15	V	L	L
16	G	G	G
17	E	E	E
18	K	R	R
19	V	A	A
20	T	T	T
21	M	I	I
22	S	N	N
(L-FR1) 23	C	C	C
<b>(L-CDR1) 24</b>	K	K	K
<b>25</b>	S	S	S
<b>26</b>	S	S	S
<b>27</b>	Q	Q	Q
<b>27A</b>	S	S	S
<b>27B</b>	L	V	<u>L</u>
<b>27C</b>	L	L	L

ES 2 531 996 T3

Numeración de Kabat y Chothia	VL de 280.46.3.4 de ratón	IGKV4-1	280.VK4-1-TSY Humanizado
<b>27D</b>	Y	Y	Y
<b>27E</b>	S	S	S
<b>27F</b>	S	S	S
<b>28</b>	N	N	N
<b>29</b>	Q	N	<u>Q</u>
<b>30</b>	K	K	K
<b>31</b>	N	N	N
<b>32</b>	C	Y	<u>I</u>
<b>33</b>	L	L	L
<b>(L-CDR1) 34</b>	A	A	A
(L-FR2) 35	W	W	W
36	Y	Y	Y
37	Q	Q	Q
38	Q	Q	Q
39	K	K	K
40	P	P	P
41	G	G	G
42	Q	Q	Q
43	S	P	P
44	P	P	P
45	K	K	K
46	L	L	L
47	L	L	L
48	I	I	I
(L-FR2) 49	Y	Y	Y
<b>(L-CDR2) 50</b>	W	W	W
<b>51</b>	A	A	A
<b>52</b>	S	S	S
<b>53</b>	S	T	<u>S</u>
<b>54</b>	R	R	R
<b>55</b>	E	E	E
<b>(L-CDR2) 56</b>	S	S	S

ES 2 531 996 T3

Numeración de Kabat y Chothia	VL de 280.46.3.4 de ratón	IGKV4-1	280.VK4-1-TSY Humanizado
(L-FR3) 57	G	G	G
58	V	V	V
59	P	P	P
60	D	D	D
61	R	R	R
62	F	F	F
63	T	S	S
64	G	G	G
65	S	S	S
66	G	G	G
67	S	S	S
68	G	G	G
69	T	T	T
70	D	D	D
71	F	F	F
72	T	T	T
73	L	L	L
74	T	T	T
75	I	I	I
76	S	S	S
77	S	S	S
78	V	L	L
79	K	Q	Q
80	T	A	A
81	E	E	E
82	D	D	D
83	L	V	V
84	A	A	A
85	V	V	V
86	Y	Y	Y
87	Y	Y	Y
(L-FR3) 88	C	C	C

Numeración de Kabat y Chothia	VL de 280.46.3.4 de ratón	IGKV4-1	280.VK4-1-TSY Humanizado
(L-CDR3) 89	Q	Q	Q
90	Q	Q	Q
91	Y	Y	Y
92	F	Y	Y
93	S	S	S
94	Y	T	<u>Y</u>
95	P	P	P
96	F		F
(L-CDR3) 97	T		T
(L-FR4) 98	F		F
99	G		G
100	S		Q
101	G		G
102	T		T
103	K		K
104	L		V
105	E		E
106	I		I
(L-FR4) 107	K		K

Con el fin de eliminar la cisteína libre, se diseñó y construyó una segunda versión de la cadena ligera humanizada, 280.VK4-1-S, enumerada en el SEQ ID NO: 31, donde la cisteína se mutó a una serina que es el cambio más conservativo posible en términos de tamaño y carácter hidrófilo. Después de la purificación con proteína A, el perfil del anticuerpo sin la cisteína (es decir, un anticuerpo 280.46.3.4. humanizado que comprende 280.VH3-66-1 emparejado con 280.VK4-1-S), en un gel SDS (Figura 5) parecía mejor que el del anticuerpo que contenía la cisteína (es decir, un anticuerpo 280.46.3.4 humanizado que comprende 280.VH3-66-1 emparejado con 280.VK4-1-C). Por mejor perfil se quiere significar que la cadena pesada y ligera se asocian más correctamente que los productos secundarios en el anticuerpo sin la cisteína no emparejada (280.VK4-1-S; "Después" en la Figura 5), en comparación con el anticuerpo que contiene la cisteína libre (280.VK4-1-C; "Antes" en la Figura 5).

La potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/Kappa humana, que comprende 280.VH3-66-1 emparejado con 280.VK4-1-S, se evaluó en tres análisis celulares distintos:

1) Análisis de fosforilación de STAT3 en células de hepatoma HepG2 humano. La línea celular de hepatoma HepG2 humano se obtuvo de la ATCC (Colección de Cultivos Tipo Americana) y se estimuló con IL-22 humana recombinante en placas de 24 pocillos. Se mezclaron diluciones seriadas de anticuerpos neutralizadores con IL-22 a  $CE_{80}$  y se añadieron a las células durante 20 min. Los productos lisados de HepG2 se sometieron a ensayo en un Kit ELISA Sándwich PathScan Phospho-STAT3 de Cell Signaling para determinar los valores de  $CI_{50}$  de los anticuerpos sometidos a ensayo. En este análisis de HepG2, se encontró que el anticuerpo humanizado era 1,4 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, que contiene la cisteína libre, purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA-6284), con valores de  $CI_{50}$  de 257,5 pM y 370,5 pM, respectivamente (Figura 6).

2) Análisis de proliferación en células BaF3. La línea celular BaF3 se transfectó con ambas cadenas del receptor de IL-22 humano (IL-22RA e IL-10RB) y se cultivó con IL-22 humana recombinante en placas de 96 pocillos. Las

diluciones seriadas de anticuerpos neutralizadores se añadieron a las células y se determinó el efecto sobre la proliferación de BaF3 mediante medición de la incorporación de timidina tritiada. En este análisis de la línea celular estable BAF-3 transfectada con el receptor de IL-22 humano, se encontró que el anticuerpo humanizado era 1,7 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, que contiene la cisteína libre, purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA-6284), con valores de  $CI_{50}$  de 340 y 587 pM, respectivamente (Figura 7).

3) Análisis de proliferación en células BaF3. La línea celular BaF3 se transfectó con ambas cadenas del receptor de IL22 murino (IL-22RA e IL-10RB) y se cultivó con IL-22 murina recombinante en placas de 96 pocillos. Las diluciones seriadas de anticuerpos neutralizadores se añadieron a las células y se determinó el efecto sobre la proliferación de BaF3 mediante medición de la incorporación de timidina tritiada. En este análisis de la línea celular estable BAF-3 transfectada con el receptor de IL-22 murino se encontró que el anticuerpo humanizado era 2,1 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón, que contiene la cisteína libre, purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA-6284), con valores de  $CI_{50}$  de 693 y 1473 pM, respectivamente (Figura 8).

En conclusión, la mutación de la cisteína libre en L-CDR1 ha mejorado drásticamente no solo las propiedades biofísicas, sino también la potencia del anticuerpo 280.46.3.4 humanizado que comprende 280.VH3-66.1 emparejado con 280.VK4-1-S, sobre IL-22RA tanto humano como de ratón, en comparación con el anticuerpo 280.46.3.4 de ratón original.

Ejemplo 4: Eliminación de un motivo de desamidación en L-CDR1 y aumento del grado de humanidad en VH de 280.46.3.4 humanizado

Los anticuerpos pueden estar sujetos a una variedad de reacciones de modificación y/o degradación química, por ejemplo, desamidación, isomerización, hidrólisis, formación incorrecta de puentes disulfuro, beta-eliminación, oxidación y formación de aductos. Los principales mecanismos hidrolíticos de degradación pueden incluir la desamidación de asparraginas especialmente cuando están seguidas inmediatamente por una glicina o una serina. La sustitución de la cisteína por una serina en L-CDR1 ha creado un motivo NS que constituye un sitio de desamidación potencial y por lo tanto debe ser eliminado. En un intento de destruir este motivo NS, se construyó una serie de mutantes (datos no mostrados). Se ha encontrado que la mejor mutación global era un cambio de serina a treonina. Este dominio variable de cadena ligera mutada (280.VK4-1-T), enumerado en el SEQ ID NO: 32, se emparejó con la versión 4 de la VH de 280.46.3.4 humanizado (280.VH3-66-4; véase más abajo) y se evaluó para determinar la potencia de inhibición en análisis basados en células.

En la versión 4 de la VH de 280.46.3.4 humanizado (280.VH3-66-4), el residuo 70 (Tabla 1) fue mutado al residuo de la línea germinal humana encontrado en esta posición, mutación de treonina a serina. Asimismo los dos últimos residuos de H-CDR2, ácido glutámico y alanina en las posiciones 64 y 65 (Tabla 1), fueron mutado a los residuos de la línea germinal humana que se encuentran en esas posiciones; lisina y glicina, respectivamente. En general, la versión 4 de la VH de 280.46.3.4 humanizado (280.VH3-66-4), enumerada en el SEQ ID NO: 33, tiene tres residuos más de la línea germinal humana en comparación con la versión 1 (280.VH3-66-1) estando localizados dos de estos residuos en H-CDR2 (Figura 9 en comparación con la Figura 4).

La potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/Kappa humana, que comprende 280.VH3-66-4 emparejado con 280.VK4-1-T, se evaluó en tres análisis celulares distintos como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3:

1) En el análisis de HepG2 se encontró que el anticuerpo humanizado era 1,8 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA-6284), con valores de  $CI_{50}$  de 183,2 y 333,0 pM, respectivamente (Figura 10).

2) En el análisis de la línea celular estable BaF3 transfectada con el receptor de IL-22 humano, se encontró que el anticuerpo humanizado era 1,75 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA-6284), con valores de  $CI_{50}$  de 334 y 587 pM, respectivamente (Figura 11).

3) En el análisis de la línea celular estable BaF3 transfectada con el receptor de IL-22 murino, se encontró que el anticuerpo humanizado era 2,1 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA-6284), con valores de  $CI_{50}$  de 687 y 1.473 pM, respectivamente (Figura 12).

Ejemplo 5: La mutación del residuo 32 de Kabat de Asp a Glu en CDR1 de VH de 280.46.3.4 humanizado aumenta la afinidad y mejora la estabilidad

Los anticuerpos se pueden someter a una variedad de reacciones de modificación y/o degradación química, por ejemplo, desamidación, isomerización, hidrólisis, formación incorrecta de puentes disulfuro, beta-eliminación, oxidación y formación de aductos. Los principales mecanismos hidrolíticos de degradación pueden incluir la isomerización de ácido aspártico (Asp). Con el fin de evitar este problema se ha elaborado un conjunto de mutantes,

en donde el Asp 32 de H-CDR1 y el Asp 96 de H-CDR3 fueron mutados individualmente en 280.VH3-66-4. Estos mutantes individuales fueron emparejados a continuación con el dominio variable de cadena ligera humanizado 280.VK4-1-T, descrito anteriormente, y los fragmentos de anticuerpo Fab purificados con NiNTA resultantes se sometieron a ensayo para la medición de la afinidad mediante Biacore. La VH que contiene la mutación Asp a Glu en la posición 32 en el H-CDR1 de denominó versión 18 o 280.VH3-66-18 y se enumera en el SEQ ID NO: 34. Los resultados del análisis Biacore que mide la unión a IL-22RA humano presentados en la Figura 13 muestran que la mutación D32E aumentó la velocidad de asociación aproximadamente 2 veces y redujo la velocidad de disociación aproximadamente 5 veces en comparación con D32 no mutado parental (280.VH3-66-4). Por otra parte, la mutación D96E tuvo un impacto negativo, reduciendo la afinidad aproximadamente 500 veces. Cuando se analizó el mutante D32E mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC) parecía ser más estable en 1 grado que el anticuerpo D32 parental (Figura 14). En general, se puede concluir que la mutación D32E mejora en gran medida las propiedades de la última versión 18 humanizada de la cadena pesada (280.VH3-66-18).

La potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/Kappa humana, que comprende 280.VH3-66.18 emparejado con 280.IGKV4-1-T, se evaluó en un análisis con células HepG2. Los resultados presentados en la Figura 15 muestran que el anticuerpo humanizado (280.VH3-66.18/VK4-1-T) es casi 3 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA-6284), con valores de  $Cl_{50}$  de 132,5 y 370,5 pM, respectivamente.

Ejemplo 6: Aumento del grado de humanidad

#### A. Cadena pesada

Después de haber aumentado la afinidad, la potencia y la estabilidad de la 280.46.3.4 humanizado en comparación con 280.46.3.4 de ratón parental, se ha diseñado una serie de mutantes en un intento de aumentar la humanidad de la versión humanizada final. El objetivo era retromutar el mayor número de residuos de marco que sea posible que fueran de origen parental de ratón a los correspondientes residuos de IGHV3-66 de la línea germinal humana. Durante este proceso, los autores de la presente invención fueron capaces de retromutar satisfactoriamente los residuos Ala 67 y Leu 69 a los residuos Phe e Ile, respectivamente (Tabla 1). También encontraron que la introducción de una isoleucina en la posición 29, en lugar de la valina presente en IGHV3-66 de la línea germinal humana, tenía un impacto positivo sobre la estabilidad térmica (datos no mostrados). A pesar del hecho de que Ile 29 no es normalmente el residuo encontrado en esta posición en IGHV3-66 de la línea germinal humana (val 29) y debido a su impacto positivo sobre la estabilidad sin pérdida de actividad, se ha decidido incorporarlo en la versión 46 de VH humanizada final (280.VH3-66-46), enumerada en el SEQ ID NO. 16. El alineamiento de secuencia de la versión VH humanizada final, 280.VH3-66-46, con IGHV3-66 de la línea germinal humana muestra que 9 residuos del marco de ratón se han conservado (Figura 16 y Tabla 1).

#### B. Cadena ligera

En la cadena ligera humanizada, donde todos los residuos del marco son humanos, se ha investigado la posibilidad de clasificar en líneas germinales los residuos de CDR. Se construyó una serie de mutantes en los residuos de CDR de ratón mutando residuos de CDR individuales al residuo de IGKV4-1 de la línea germinal humana encontrado en la posición equivalente. Los mutantes se escrutaron mediante calorimetría de barrido diferencial y Biacore para escrutar la estabilidad térmica y la afinidad, respectivamente. Se ha encontrado que la Phe en la posición 92 en L-CDR3 (Tabla 2) podría ser remplazada por el residuo Tyr presente en esta posición en IGKV4-1 de la línea germinal humana con una ganancia de 1 grado Celsius en la estabilidad térmica y sin pérdida de afinidad. Esta secuencia de VL humanizada optimizada, denominada 280.VK4-1-TSY, se enumera en el SEQ ID NO. 17. Su alineamiento con el IGKV4-1 de la línea germinal humana, mostrado en la Figura 17, indica que 280.VK4-1-TSY tiene una identidad muy alta con la secuencia de IGKV4-1 de la línea germinal completa, incluyendo los residuos de los marcos y de las CDR, ya que las secuencias difieren solamente en 5 posiciones (Figura 17 y Tabla 2).

Todos los anticuerpos humanizados mencionados anteriormente han sido producidos conectando el dominio variable de cadena pesada específico con la región constante indicada en SEQ ID NO: 18 y el dominio variable de cadena ligera específico con el dominio constante indicado en el SEQ ID NO: 19. Se debe observar que estas regiones constantes se han utilizado como un ejemplo y pueden ser remplazadas fácilmente por otras diferentes debido a que la afinidad y la especificidad de unión de los anticuerpos residen en los dominios variables. Con respecto a los Fab citados anteriormente, estos comprenden el primer dominio constante de cadena pesada (CH1) de la secuencia indicada en el SEQ ID NO: 18 y el dominio constante de cadena ligera indicado en el SEQ ID NO: 19.

Los diferentes anticuerpos humanizados y los Fab mencionados en los ejemplos se han producido en células CHO utilizando un único vector de expresión, que comprende los ADNc que codifican la cadena pesada y ligera bajo el control de dos promotores diferentes.

Ejemplo 7: Potencia de VH de 280.VH3-66-46 humanizado emparejada con VL de 280.VK4-1-TSY en análisis con células que expresan IL-22RA humano

La potencia del anticuerpo humanizado expresado como una IgG1/Kappa humana, que comprende 280.VH3-66.46

emparejado con 280.IGKV4-1-TSY, se evaluó en tres análisis celulares distintos.

El término "280.346.TSY" se utiliza de aquí en adelante para indicar un anticuerpo humanizado anti-IL-22RA humano que comprende 280.VH3-66.46 emparejado con 280.IGKV4-1-TSY, independientemente de las regiones constantes de la cadena pesada y ligera.

5 1) Análisis de fosforilación de STAT3 en queratinocitos humanos normales. Se obtuvieron queratinocitos humanos normales de Biopredic International y se estimularon con IL-22 humana recombinante en placas de 96 pocillos. Las diluciones seriadas de los anticuerpos neutralizadores se mezclaron con IL-22 a  $CE_{80}$  y se añadieron a las células durante 20 min. Los productos lisados de queratinocitos se sometieron a ensayo en un Kit ELISA Sándwich PathScan Phospho-STAT3 de Cell Signaling para determinar los valores de  $CI_{50}$  de los anticuerpos sometidos a ensayo. En este análisis de queratinocitos humanos normales, se encontró que 280.346.TSY era casi 9 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA-6284), con valores de  $CI_{50}$  de 60,95 y 541,9 pM, respectivamente (Figura 18).

15 2) Análisis de fosforilación de STAT3 en células HepG2. La línea celular de hepatoma humano HepG2 se obtuvo de la ATCC (Colección de Cultivos Tipo Americana) y se estimuló con IL-22 humana recombinante en placas de 24 pocillos. Se mezclaron diluciones seriadas de anticuerpos neutralizadores con IL-22 a  $CE_{80}$  y se añadieron a las células durante 20 min. Los productos lisados de HepG2 se sometieron a ensayo en un Kit ELISA Sándwich PathScan Phospho-STAT3 de Cell Signaling para determinar los valores de  $CI_{50}$  de los anticuerpos sometidos a ensayo. En este análisis de HepG2, se encontró que 280.346.TSY era casi 5 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA-6284), con valores de  $CI_{50}$  de 55,16 y 266,3 pM, respectivamente (Figura 19).

20 3) Análisis de proliferación en células BaF3. La línea celular BaF3 se transfectó con ambas cadenas del receptor de IL-22 humano (IL-22RA y IL-10RB) y se cultivaron con IL-22 humana recombinante en placas de 96 pocillos. Las diluciones seriadas de los anticuerpos neutralizadores se añadieron a las células y se determinó el efecto sobre la proliferación de BaF3 mediante la medición de la incorporación de timidina tritiada. En este análisis de la línea celular estable BaF3 transfectada con el receptor de IL-22 humano, se encontró que 280.346.TSY era 1,7 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA 6284), con valores de  $CI_{50}$  de 317 y 545 pM, respectivamente (Figura 20).

25 Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de un 280.346.TSY concreto se enumeran en los SEQ ID NO: 18 y 19 respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera completas de dicho 280.346.TSY concreto se enumeran en los SEQ ID NO: 20 y 21, respectivamente.

Ejemplo 8: Potencia de 280.346.TSY humanizado en análisis de células que expresan IL-22RA de ratón

La potencia de 280.346.TSY se evaluó en dos análisis celulares distintos:

35 1) Análisis de fosforilación de STAT3 en células Hepa1-6. La línea celular de hepatoma murino Hepa1-6 se obtuvo de DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) y se estimuló con IL-22 murina recombinante en placas de 96 pocillos. Las diluciones seriadas del anticuerpo neutralizador se mezclaron con IL-22 a  $CE_{80}$  y se añadieron a las células durante 20 min. Se ha utilizado una IgG1 humana como control. Los productos lisados de Hepa1-6 se sometieron a ensayo en un Kit ELISA Sándwich PathScan Phospho-STAT3 de Cell Signaling para determinar los valores de  $CI_{50}$  de los anticuerpos sometidos a ensayo. En este análisis de células Hepa1-6, se encontró que 280.346.TSY inhibía la actividad de IL-22 murina con una  $CI_{50}$  en el intervalo nanomolar (2,1 nM; Figura 21).

40 2) Análisis de proliferación en células BaF3. La línea celular BaF3 se transfectó con ambas cadenas del receptor de IL-22 murino (IL-22RA y IL-10RB) y se cultivó con IL-22 murina recombinante en placas de 96 pocillos. Las diluciones seriadas de los anticuerpos neutralizadores se añadieron a las células y se determinó el efecto sobre la proliferación de BaF3 mediante la medición de la incorporación de timidina tritiada. En este análisis de la línea celular estable BaF3 transfectada con receptor de IL-22 de ratón, se encontró que 280.346.TSY era 6,2 veces más potente que el anticuerpo parental de ratón purificado a partir del hibridoma 280.46.3.4 (Denominación de Depósito de Patentes de la ATCC PTA 6284), con valores de  $CI_{50}$  de 137 y 849 pM, respectivamente (Figura 22).

45 Ejemplo 9: Selectividad de unión de 280.346.TSY sobre proteínas relacionadas con IL22RA mediante ELISA competitivo

50 Se determinaron la especificidad y la afinidad de unión de 280.346.TSY utilizando un ELISA competitivo. Las placas de microtitulación se recubrieron con IL-22RA-ECD humano (es decir, IL-22RA-Dominio Extracelular). Se añadió anticuerpo 280-346-TSY biotinilado a la placa en presencia de competidores: receptor alfa de interleuquina 22 humano (hIL-22RA), proteína de unión a IL-22 humana (hIL-22BP), receptor alfa de IL-22 de ratón (MIL-22RA), receptor alfa de IL-10 humano (hIL-10R) y receptor alfa de IL-20 humana (hIL-20R). La unión a hIL-22RA aplicado como recubrimiento sobre las placas se reveló mediante la adición de estreptavidina conjugada con peroxidasa. Los valores de  $CI_{50}$  medidos para IL-22RA humano y murino recombinantes fueron 18,25 pM y 149,3 pM,

respectivamente (Figura 23). El anticuerpo monoclonal no mostró reactividad cruzada con IL-22BP, IL-10R e IL-20R humanos recombinantes.

Ejemplo 10: Reactividad cruzada de 280-346-TSY contra ortólogos de IL-22RA evaluada mediante la medición de Kd por KinExA y Biacore.

- 5 Se evaluó la Kd de 280-346-TSY utilizando aparatos Biacore y KinExA. Los dominios extracelular (ECD) de IL22RA de secuencias de genes humanos y homólogos encontradas en diferentes especies (rata, ratón, perro, mono rhesus, mono cynomolgus y mono tití) se produjeron en células HEK-293 y se purificaron con NiNTA utilizando una etiqueta 6-His. El anticuerpo 280-346-TSY tiene una afinidad subnanomolar por IL-22RA de ser humano y de las tres especies de monos sometidas a ensayo. Tiene una afinidad nanomolar por IL-22RA de ratón, con una afinidad aproximadamente 100 veces menor en comparación con el humano y una afinidad micromolar por el de rata (Tabla 3).

Tabla 3. Medición de la afinidad Kd del anticuerpo monoclonal 280-346-TSY sobre IL-22RA-ECD y sus ortólogos.

IL-22RA-ECD	Kd KinExA	Kd Biacore
Humano	~28,5 pM	~ 150 pM
Ratón	~4,85 nM	~ 20 nM
Rata	~587 nM	~ 1 µM
Rhesus	~137 pM	ND
Cynomolgus	~64,5 pM	ND
Tití	~38,5 pM	400 pM
Perro	No determinado (ND)	100 nM

Ejemplo 11: Eficacia de 280-346-TSY sobre amiloide A en suero inducido por IL-22 en ratones

- 15 Se determinó la actividad farmacodinámica de 280-346-TSY sobre amiloide A en suero inducido por IL-22 en ratones Balb/c macho. Se administraron diferentes dosis de 280.346.TSY por vía subcutánea 22 horas antes de la inyección intravenosa con IL-22 murina recombinante. El control de vehículo PBS administrado por vía subcutánea a 10 ml/kg.

- Los ratones recibieron 100 µg/kg de IL-22 en el plexo retroorbital bajo anestesia con isoflurano. La toma de muestras de sangre se realizó 6 horas después de la inyección de IL-22 por punción cardiaca bajo anestesia con isoflurano. Se utilizó IgG1 humana como control negativo (control de isotipo). El amiloide A en suero se determinó mediante ELISA (Biosource). 280-346-TSY proporcionó un valor de DE<sub>50</sub> de 0,5 mg/kg. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para realizar análisis estadísticos: \* p< 0,05 vs grupo de control de isotipo; \*\*\* p <0,001 vs. grupo de control de isotipo (Figura 24).

Ejemplo 12: Eficacia de 280-346-TSY sobre la inflamación de la oreja inducida por IL-23 en ratones

- 25 Se determinó la actividad farmacodinámica de 280-346-TSY en un modelo de psoriasis de ratón. Se sometió a ensayo la eficacia de 280-346-TSY sobre el engrosamiento de la oreja inducido por IL-23 en ratones C57BL/6 hembra. Se inyectaron a los ratones 500 ng de IL-23 humana recombinante o PBS en un volumen total de 20 µl en días alternos durante 14 días como describen Zheng Y et al. (Nature 2007). Se administraron diferentes dosis de 280.346.TSY por vía subcutánea en días alternos administrando la primera dosis antes de la primera administración de IL-23 recombinante. El control de vehículo es PBS administrado por vía subcutánea a 10 ml/kg. Se utilizó dexametasona (DEXA) como control positivo. El porcentaje de inhibición se calculó en el día 9 que corresponde al pico de hinchazón de la oreja. 280-346-TSY proporcionó un valor de DE<sub>50</sub> de 1,8 mg/kg (Figura 25).

SEQ ID NO:	Descripción de la Secuencia
1	H-CDR1 (AEYMN)
2	H-CDR2 (EINPSTGTTTYNQKFKG)
3	H-CDR3 (FDAYFDY)
4	L-CDR1 (KSSQSLLYSSNQKNTLA)

ES 2 531 996 T3

SEQ ID NO:	Descripción de la Secuencia
5	L-CDR2 (WASSRES)
6	L-CDR3 (QQYYSYPFT)
7	L-CDR3 alternativa (QQYFSYPFT)
8	H-FR1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSIT)
9	H-FR2 (WVRQAPGKGLEWIG)
10	H-FR3 (RFTISVDQSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR)
11	H-FR4 (WGQGTLVTVSS)
12	L-FR1 (DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC)
13	L-FR2 (WYQQKPGQPPKLLIY)
14	L-FR3 (GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYC)
15	L-FR4 (FGQGTKVEIKR)
16	VH humanizada final (280.VH3-66-46)
17	VL humanizada final (280.VK4-1-TSY)
18	Región constante de cadena pesada de un 280.346.TSY concreto
19	Dominio constante de cadena ligera de un 280.346.TSY concreto
20	Cadena pesada de un 280.346.TSY concreto
21	Cadena ligera de un 280.346.TSY concreto
22	ADNc que codifica la cadena pesada de un 280,346.TSY concreto
23	ADNc que codifica la cadena ligera de un 280,346.TSY concreto
24	Secuencia de aminoácidos de IL-22RA humano
25	Dominio variable de cadena pesada de 280.46.3.4 de ratón
26	Dominio variable de cadena ligera de 280.46.3.4 de ratón
27	Inmunoglobulina kappa variable 4-1 (IGKV4-1)
28	Inmunoglobulina pesada variable 3-66 (IGHV3-66)
29	Primera versión de VL de 280.46.3.4 humanizado (280.VK4-1-C)
30	Primera versión de humanizada VH de 280.46.3.4 (280.VH3-66.1)
31	Segunda versión de VL de 280.46.3.4 humanizado (280.VK4-1-S)
32	Tercera versión de VL de 280.46.3.4 humanizado (280.VK4-1-T)
33	Versión 4 de la VH de 280.46.3.4 humanizado (280.VH3-66-4)
34	Versión 18 de la VH de 280.46.3.4 humanizado (280.VH3-66-18)

**Lista de Referencias**

1. Aggarwal S, Xie MH, Maruoka M, Foster J, Gurney AL. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J. Interferon Cytokine Res.* 2001; 21: 1047-53.
- 5 2. Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 1997; 273(4): 927-48.
3. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005; 129: 969-84.
- 10 4. Aviv H y Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69(6): 1408-12.
5. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18(24): 5294-9.
6. Chothia C y Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 1987; 196: 901-917.
- 15 7. Dumoutier L, Van Roost E, Colau D, Renauld JC. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as a hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 10144-49.
8. Francis GE, Fisher D, Delgado C, Malik F, Gardiner A, Neale D. PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques. *Int J Hematol.* 1998; 68(1): 1-18.
- 20 9. Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP. IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: D256-61.
10. Harris JM y Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2(3): 214-21.
11. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 1037-46.
- 25 12. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1991
13. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol.* 2001; 166: 7096-7103.
- 30 14. Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Doecke WD, Volk HD, Sterry W, Asadullah K, Sabat R. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Experimental Dermatology* 2006; 15: 991-1004.
15. Langer JA, Cutrone EC, Kotenko S. The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine & Growth Factor Review* 2004; 15: 33-48.
- 35 16. Li J, Tomkinson KN, Tan X, Wu P et al. Temporal associations between interleukin 22 and the extracellular domains of IL-22R and IL-10R2. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4(5):693-708.
17. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683-765.
- 40 18. Nograles KE, Brasington RD, Bowcock AM. New insights into the pathogenesis and genetics of psoriatic arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2009a; 5(2): 83-91.
19. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, Ramon M, Bergman R, Krueger JG, Guttman-Yassky E. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009b; 123(6): 1244-52.
- 45 20. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; 21: 241-54.
21. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007; 445: 648-51.

- 22. WO 2006/047249
- 23. WO 99/07848

**Listado de secuencias**

<110> Merck Serono S.A.

5 <120> Humanized antibodies against human IL-22RA

<130> P 09/068 WO/PCT

<150> EP 09176525.5

10 <151> 2009-11-19

<150> US 61/262,998

<151> 2009-11-20

15 <160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> H-CDR1

<400> 1

Ala Glu Tyr Met Asn

1 5

30 <210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> H-CDR2

<400> 2

40 Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 7

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> H-CDR3

50 <400> 3

Phe Asp Ala Tyr Phe Asp Tyr

1 5

55 <210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

60 <220>

<223> L-CDR1

ES 2 531 996 T3

<400> 4

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

Ala

5

<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> L-CDR2

<400> 5

15

Trp Ala Ser Ser Arg Glu Ser  
1 5

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> L-CDR3

25

<400> 6

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr  
1 5

30

<210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> Alternative L-CDR3

<400> 7

40

Gln Gln Tyr Phe Ser Tyr Pro Phe Thr  
1 5

<210> 8  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Artificial

45

<220>  
<223> H-FR1

50

<400> 8

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 Tyr Ser Ile Thr  
20 25 30

55

<210> 9  
<211> 14  
<212> PRT

ES 2 531 996 T3

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> H-FR2  
 5 <400> 9  
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10  
 10 <210> 10  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> H-FR3  
 <400> 10  
 Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Gln Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln  
 1 5 10 15  
 20 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 20 25 30  
 <210> 11  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> H-FR4  
 30 <400> 11  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10  
 35 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> L-FR1  
 <400> 12  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys  
 20  
 45 <210> 13  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> L-FR2  
 <400> 13  
 55

ES 2 531 996 T3

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

5 <210> 14  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> L-FR3  
 <400> 14

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

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

15 <210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> L-FR4  
 <400> 15

25 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 1 5 10

30 <210> 16  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> VH humanizado final (280.VH3-66-46)

35 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (31)..(35)  
 <223> H-CDR1 (i.e. SEQ ID NO: 1)

40 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (50)..(66)  
 <223> H-CDR2 (i.e. SEQ ID NO: 2)

45 <220>  
 <221> UNIÓN  
 <222> (99)..(105)  
 <223> H-CDR3 (i.e. SEQ ID NO: 3)

50 <400> 16

ES 2 531 996 T3

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 Tyr Ser Ile Thr Ala Glu  
 20 25 30  
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Gln Ser Lys Asn Thr Ala 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 Phe Asp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser  
 115

- 5 <210> 17
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 10 <220>
- <223> VL humanizado final (280.VK4-1-TSY)
- 15 <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (24)..(40)
- <223> L-CDR1 (i.e. SEQ ID NO: 4)
- 20 <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (56)..(62)
- <223> L-CDR2 (i.e. SEQ ID NO: 5)
- 25 <220>
- <221> UNIÓN
- <222> (95)..(103)
- <223> L-CDR2 (i.e. SEQ ID NO: 6)
- <400> 17

# ES 2 531 996 T3

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

Lys Arg

<210> 18  
<211> 329  
5 <212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Región constante de cadena pesada de un 280.346.TSY particular

<400> 18

ES 2 531 996 T3

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

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

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
195 200 205

Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
245 250 255

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

ES 2 531 996 T3

<210> 19  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Dominio constante de cadena ligera de un 280.346.TSY particular  
  
 10 <400> 19  
  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 1 5 10 15  
  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 20 25 30  
  
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 35 40 45  
  
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 50 55 60  
  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 65 70 75 80  
  
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 85 90 95  
  
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105  
  
 15 <210> 20  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Cadena pesada de un 280.346.TSY particular  
  
 <220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (1)..(116)  
 25 <223> Dominio variable de cadena pesada (i.e. SEQ ID NO: 16)  
  
 <220>  
 <221> CARACTERISTICA\_MISC  
 <222> (117)..(445)  
 30 <223> Región constante de cadena pesada (i.e. SEQ ID NO: 18)  
  
 <400> 20

ES 2 531 996 T3

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 Tyr Ser Ile Thr Ala Glu  
 20 25 30  
 Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Gln Ser Lys Asn Thr Ala 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 Phe Asp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 115 120 125  
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 130 135 140  
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 165 170 175  
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu  
 180 185 190

ES 2 531 996 T3

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

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu  
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys  
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys  
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys  
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys  
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser  
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys  
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln  
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly  
 385 390 395 400

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

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

- 5 435 440 445  
 <210> 21  
 <211> 220  
 <212> PRT  
 <213> Artificial
- 10 <220>  
 <223> Cadena ligera de un 280.346.TSY particular
- <220>  
 <221> DOMINIO
- 15 <222> (1)..(114)  
 <223> Dominio variable de cadena ligera (i.e. SEQ ID NO: 17)

ES 2 531 996 T3

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (115)..(220)  
 <223> Dominio constante de cadena ligera (i.e. SEQ ID NO: 19)

5

<400> 21

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ser Arg Glu Ser Gly Val  
 50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
 100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 130 135 140

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

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

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

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

10

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215 220

<210> 22  
 <211> 1335  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> cDNA que codifica la cadena pesada de un 280.346.TSY particular

20

<400> 22

ES 2 531 996 T3

gaggtgcagc tggctcgagag cggcggaggg ctggtgcagc caggcgggaag cttgaggctg 60  
 tcctgcgccg ccagcgggcta cagcatcacc gccgagtaca tgaactgggt gcggcaggcc 120  
 ccaggcaagg gcctggaatg gatcggcgag atcaacccca gcaccggcac caccacctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcag gttcaccatc agcgtggacc agagcaagaa caccgcctac 240  
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgcccgtg actactgctc cagattcgac 300  
 gcctacttctg actactgggg acagggcacc ctggtgaccg tgagcagcgc tagcaccaag 360  
 ggccccagcg tgttccccct ggccccagc agcaagtcca caagcggagg aacagccgcc 420  
 ctgggctgcc tgggtgaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgtcctg gaacagcggg 480  
 gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc 540  
 ctgagcagcg tgggtgacagt gccaagcagc agcctgggaa cccagacctc catctgcaac 600  
 gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggty gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac 660  
 aagaccata cctgtccacc ctgcccagcc cccccagtg cggaccctc cgtgttcctg 720  
 tccccccca agcccgaagga cacctgatg atcagcagga cccccaggt gacctgcgtg 780  
 gtggtggacg tgagccacga ggaccagag gtgaagtcca attggtatgt ggacggcgtg 840  
 gaggtgcaca acgccaagac caagcccaga gaggaacagt acaacagcac ctacagggtg 900  
 gtgtccgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggaata caagtgcaag 960  
 gtctccaaca aggccctgcc ctccagcatc gagaaaacca tcagcaaggc caagggccag 1020  
 ccacgggagc cccaggtgta cacactgcc ccactctggg aagaaatgac caagaaccag 1080  
 gtgtccctga cctgtctggt gaagggctt taccacagc acatcgcctg ggagtgggag 1140  
 agcaacggcc agcccagaa caactacaag accaccccc ctgtgctgga cagcgacggc 1200  
 agcttcttcc tgtacagcaa gctgaccgtg gacaagtcca ggtggcagca gggcaacgtg 1260  
 ttcagctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acacacagaa gagcctgagc 1320  
 ctgtcccccg gcaag 1335

- 5 <210> 23
- <211> 660
- <212> DNA
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> cDNA que codifica la cadena ligera de un 280.346.TSY particular

<400> 23  
 gacatcgtga tgaccagag ccccagacagc ctggccgtaa gcttgggcca gagggccacc 60  
 atcaactgca agagcagcca gagcctgctg tttctctcca accagaagaa caccctggcc 120  
 tggatcagc agaagcccgg ccagcccccc aagctgctga tctactgggc cagcagccgg 180  
 gagagcggcg tgcccagacag gttcagcggc agcggctccg gcaccgactt caccctgacc 240  
 atcagcagcc tgcaggccga ggacgtggcc gtgtactact gccagcagta ctacagctac 300  
 cccttcacct tcggccaggg caccaaggty gagatcaaga ggaccgtggc cgccccagc 360  
 gtgttcatct tccccccag cgacgagcag ctgaagagcg gcaccgccag cgtggtgtgc 420  
 ctgctgaaca acttttacct ccgggaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgcctg 480  
 cagagcggca acagccagga aagcgtcacc gagcaggaca gcaaggactc cacctacagc 540  
 ctgagcagca ccctgacct gagcaaggcc gactacgaga agcacaagggt gtacgcctgc 600  
 gaggtgacct accagggcct gtccagcccc gtgaccaaga gcttcaacag gggcaggtgc 660

15

ES 2 531 996 T3

<210> 24  
<211> 574  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

<400> 24

Met Arg Thr Leu Leu Thr Ile Leu Thr Val Gly Ser Leu Ala Ala His  
1 5 10 15

Ala Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser  
20 25 30

Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr  
35 40 45

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

ES 2 531 996 T3

Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn  
65 70 75 80

Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val  
85 90 95

Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg  
100 105 110

Phe Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys  
115 120 125

Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr  
130 135 140

Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe  
145 150 155 160

His Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln  
165 170 175

Met His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr  
180 185 190

Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp  
195 200 205

Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp  
210 215 220

Arg Thr Trp Thr Tyr Ser Phe Ser Gly Ala Phe Leu Phe Ser Met Gly  
225 230 235 240

Phe Leu Val Ala Val Leu Cys Tyr Leu Ser Tyr Arg Tyr Val Thr Lys  
245 250 255

Pro Pro Ala Pro Pro Asn Ser Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe  
260 265 270

Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln Glu His Val Leu Ile Pro Val Phe Asp  
275 280 285

Leu Ser Gly Pro Ser Ser Leu Ala Gln Pro Val Gln Tyr Ser Gln Ile  
290 295 300

Arg Val Ser Gly Pro Arg Glu Pro Ala Gly Ala Pro Gln Arg His Ser



ES 2 531 996 T3

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

5 <210> 26  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 26

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

15 <210> 27  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Inmunoglobulina kappa variable 4-1 (IGKV4-1)

ES 2 531 996 T3

<400> 27

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

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

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro  
100

5

<210> 28

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Inmunoglobulina pesada variable 3-66 (IGHV3-66)

<400> 28

15

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 Val Ser Ser Asn  
20 25 30

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

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

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

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

Arg

<210> 29

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Primera versión de 280.46.3.4 VL (280.VK4-1-C) humanizado

25

<400> 29

ES 2 531 996 T3

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ser Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

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

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

Tyr Phe Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

5

<210> 30  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Primera versión de 280.46.3.4 VH (280.VH3-66.1) humanizado

15

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 Tyr Ser Leu Thr Ala Asp  
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Glu Ala Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Gln Ser Lys Asn Thr Ala 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 Phe Asp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110

Thr Val Ser Ser  
115

20

<210> 31  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 531 996 T3

<220>

<223> Segunda versión de 280.46.3.4 VL (280.VK4-1-S) humanizado

5 <400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ser Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

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

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

Tyr Phe Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

<210> 32

10 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Tercera versión de 280.46.3.4 VL (280.VK4-1-T) humanizado

<400> 32

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ser Arg Glu Ser Gly Val  
50 55 60

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

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

Tyr Phe Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105 110

Lys

ES 2 531 996 T3

<210> 33  
<211> 116  
<212> PRT  
5 <213> Artificial

<220>  
<223> versión 4 del 280.46.3.4 VH (280.VH3-66-4) humanizado

10 <400> 33

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 Tyr Ser Leu Thr Ala Asp  
20 25 30  
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Gln Ser Lys Asn Thr Ala 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 Phe Asp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110  
Thr Val Ser Ser  
115

15 <210> 34  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Versión 18 del 280.46.3.4 VH (280.VH3-66-18) humanizado

<400> 34

# ES 2 531 996 T3

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 Tyr Ser Leu Thr Ala Glu  
20 25 30  
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Thr Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60  
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Gln Ser Lys Asn Thr Ala 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 Phe Asp Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
100 105 110  
Thr Val Ser Ser  
115

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo humanizado que se une a IL-22RA humano, que comprende:
  - a) un dominio variable de cadena pesada que comprende H-CDR1, H-CDR2, y H-CDR3 que consiste en secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente; y
  - 5 b) un dominio variable de cadena ligera que comprende L-CDR1, L-CDR2, y L-CDR3 que consiste en secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, o que consiste en las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 4, 5 y 7, respectivamente.
2. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
  - 10 a) dicho dominio variable de cadena pesada comprende las regiones marco H-FR1, H-FR2, H-FR3 y H-FR4 que consisten en las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 8, 9, 10 y 11, respectivamente, y
  - b) dicho dominio variable de cadena ligera comprende las regiones marco L-FR1, L-FR2, L-FR3 y L-FR4 que consisten en las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 12, 13, 14, y 15 respectivamente.
3. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde:
  - 15 a) dicho dominio variable de cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 16 y
  - b) dicho dominio variable de cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 17.
4. El anticuerpo humanizado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho anticuerpo comprende:
  - a) una región constante de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 18 y
  - b) un dominio constante de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 19.
- 20 5. Un anticuerpo humanizado que se une a IL-22RA humano, que comprende una cadena pesada que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 20 y una cadena ligera que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 21.
6. Un polinucleótido que codifica tanto la cadena pesada como la cadena ligera del anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 5.
- 25 7. Un vector de expresión que comprende a) un polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 5 y b) un polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 5.
8. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6.
9. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde el polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 5 comprende o consiste en el SEQ ID NO: 22 y el polinucleótido que codifica la cadena ligera del anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 5 comprende o consiste en el SEQ ID NO: 23.
- 30 10. Una célula anfitriona transformada con un vector de acuerdo con la reivindicación 7, 8 o 9.
11. La célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha célula es una célula CHO.
- 35 12. Un método para producir un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho método comprende cultivar una célula anfitriona de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, y aislar dicho anticuerpo.
13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un anticuerpo humanizado producido de acuerdo con el método de la reivindicación 12.
- 40 14. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un anticuerpo humanizado producido de acuerdo con el método de la reivindicación 12 para su uso como medicamento.
15. Un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un anticuerpo humanizado producido de acuerdo con el método de la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de la psoriasis, la artritis psoriásica o la dermatitis atópica.
- 45 16. El uso de un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un anticuerpo humanizado producido de acuerdo con el método de la reivindicación 12 para la preparación de un medicamento

ES 2 531 996 T3

para el tratamiento de la psoriasis, la artritis psoriásica o la dermatitis atópica.

**Figura 1**

IGKV4-1 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQS SVLYSSNNKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYWASTR  
 280.46.3.4 DIVMTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNCLAWYQOKPGQSPKLLIYWASSR  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*,\*,\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*  
 IGHV3-66 ESGVDFRFGSGSGTDFILTISSSLQAEDVAVYYCQQYYSTP  
 280.46.3.4 ESGVDFRFGSGSGTDFILTISSVKTEDLAVYYCQQYFSYPTFFGSGTKLEIK  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\* \*

**Figura 2**

IGHV3-66 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIY-SGGSTYY  
 280.46.3.4 EVQLQQSGPELVRPGTTSVKISCKASGYSLTADYMNWVKQSPESLEWIGEINPSTGTTY  
 \*\*\*\*:\*\*\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\*  
 IGHV3-66 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR----FDYWGQGTLVTVSS  
 280.46.3.4 NQKFEAKATLTVDQSSNTAYLQLTSLTSEDSAVYYCARFDAYFDYWGQGTLVTVSS  
 :...: \* \*\*: \*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\*

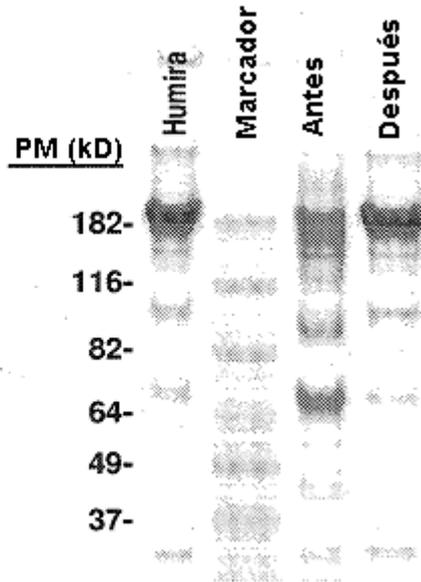
**Figura 3**

IGKV4-1 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQS SVLYSSNNKNYLAWYQOKPGQPPKLLIYWASTR  
 280.VK4-1-C DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSQSLLYSSNQKNCLAWYQOKPGQPPKLLIYWASSR  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*  
 IGHV3-66 ESGVDFRFGSGSGTDFILTISSSLQAEDVAVYYCQQYYSTP  
 280.VK4-1-C ESGVDFRFGSGSGTDFILTISSSLQAEDVAVYYCQQYFSYPTFFGQGTKEIK  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\* \*

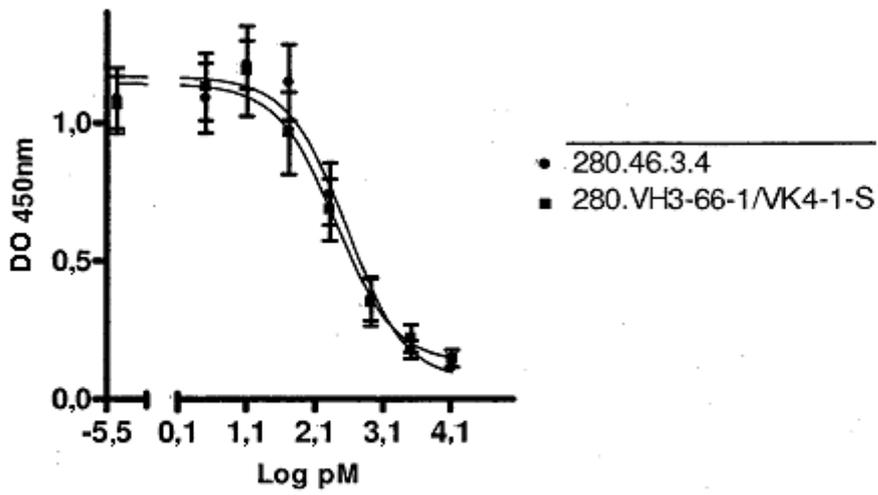
**Figura 4**

280.VH3-66.1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSLTADYMNWVRQAPGKLEWIGEINPSTGTTY  
 IGHV3-66 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKLEWVSVIY-SGGSTYY  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*  
 280.VH3-66.1 NQKFEARATLTVDQSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFDAYFDYWGQGTLVTVSS  
 IGHV3-66 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR----FDYWGQGTLVTVSS  
 :...: \* \*\*: \*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\* \*\*:\*

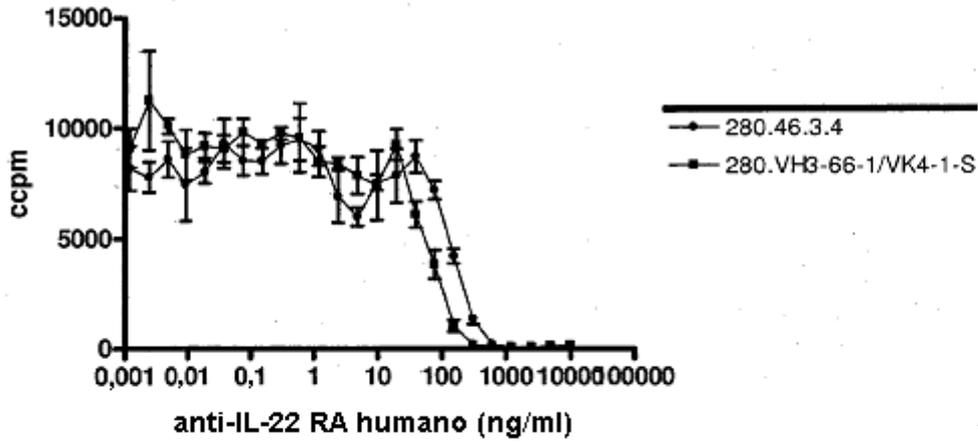
**Figura 5**



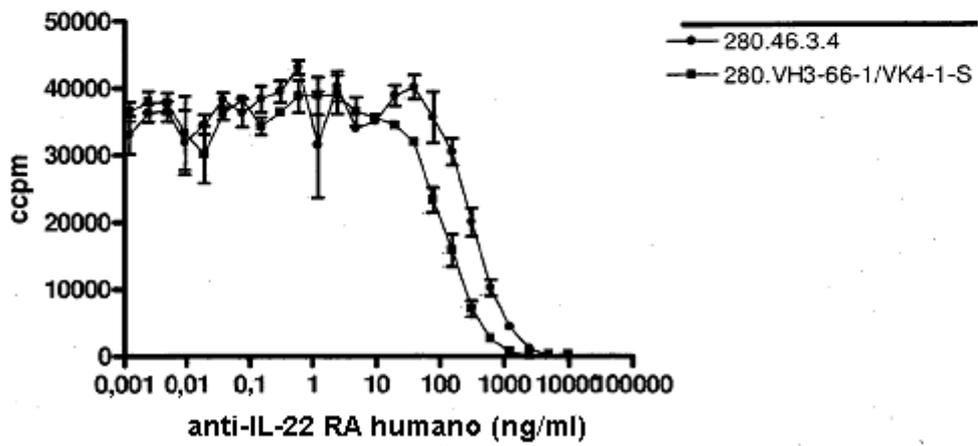
**Figura 6**



**Figura 7**



**Figura 8**



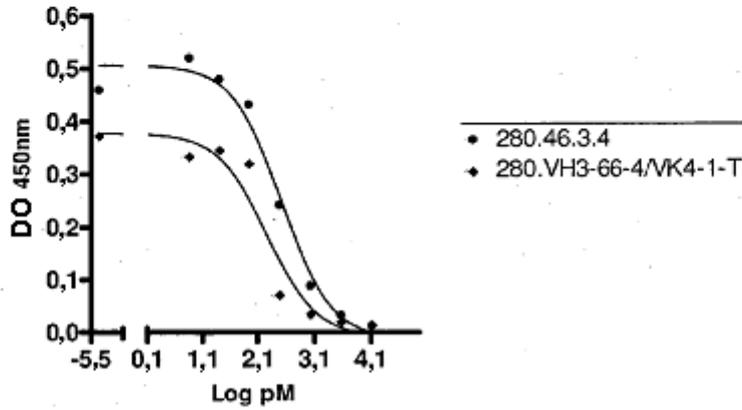
**Figura 9**

```

IGHV3-66      EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIY-SGGSTYY
280.VH3-66-4  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSLTADYMNWVRQAPGKLEWIGEINPSTGTTY
*****
:..** * *:* *:* *****

IGHV3-66      ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR----FDYWGQGITLVTVSS
280.VH3-66-4  NOKFKGRATLSVDQSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFDAYFDYWGQGITLVTVSS
:..** * *:* *:* *****
    
```

**Figura 10**



**Figura 11**

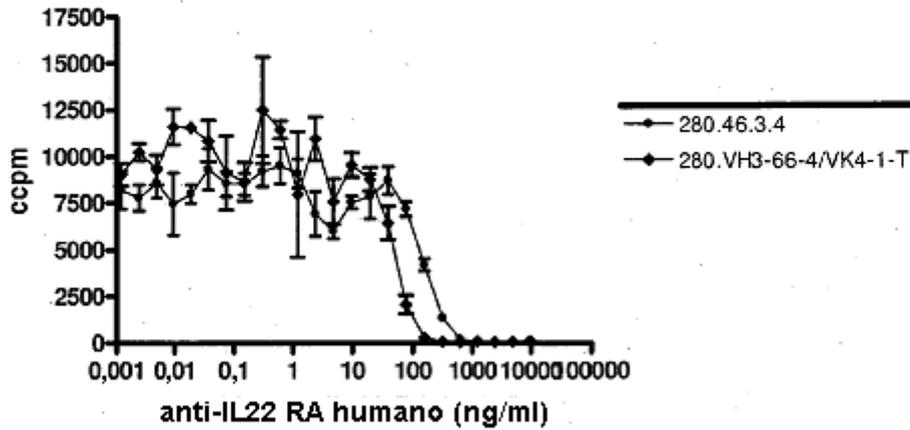


Figura 12

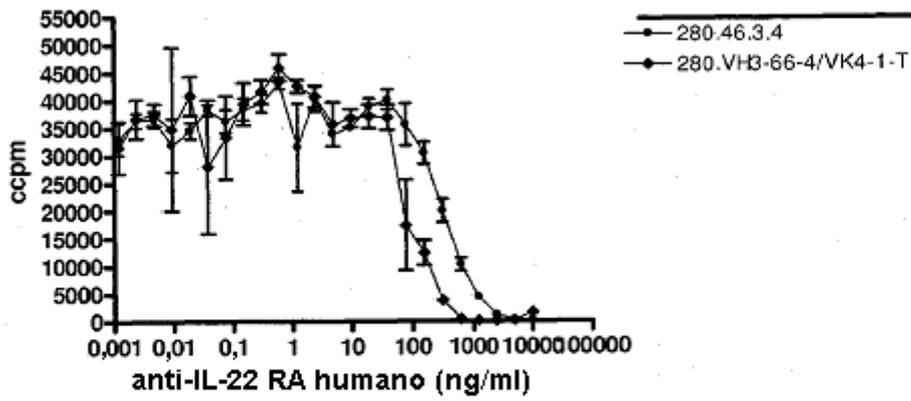
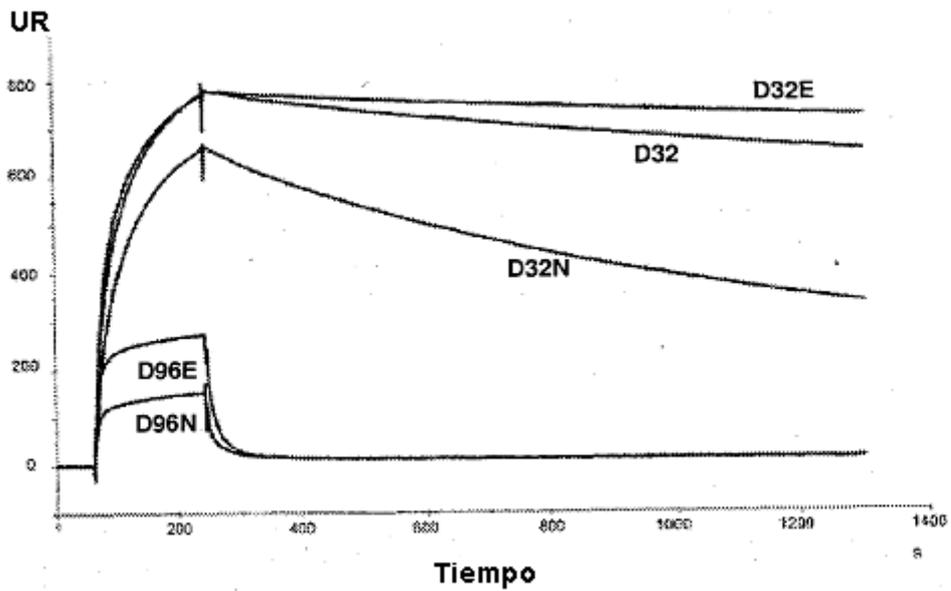
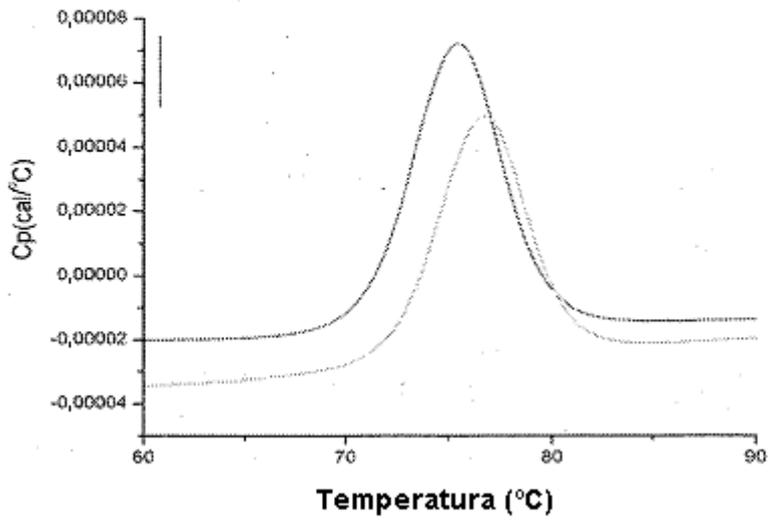


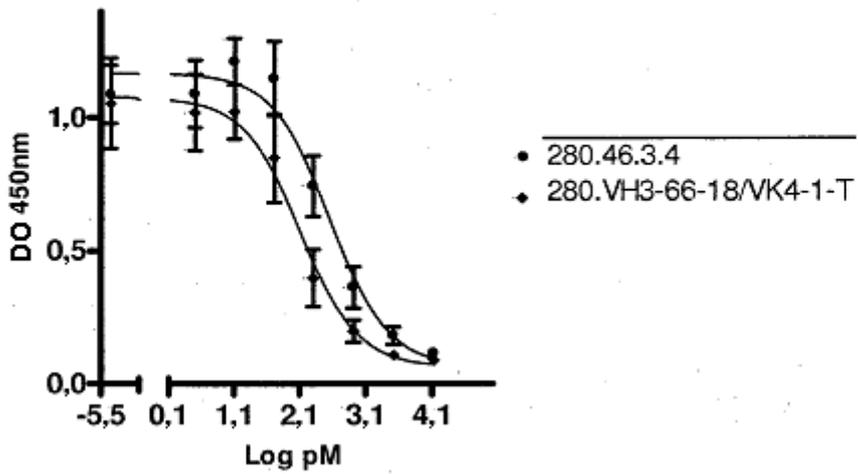
Figura 13



**Figura 14**

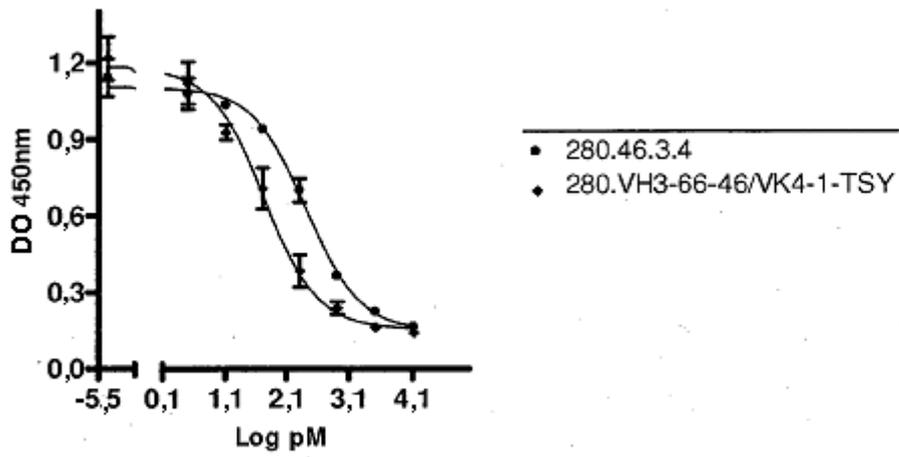


**Figura 15**

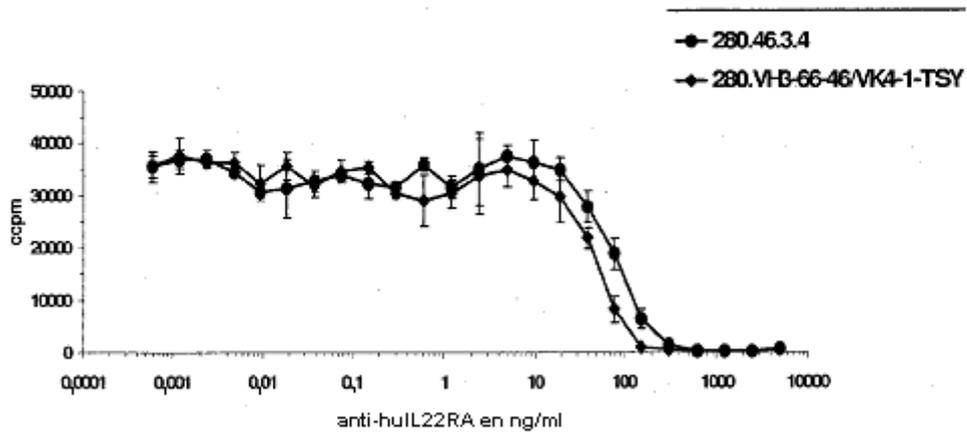




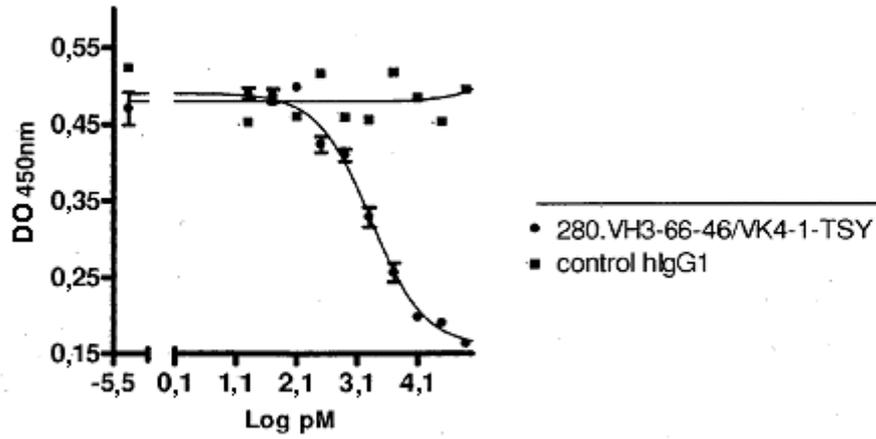
**Figura 19**



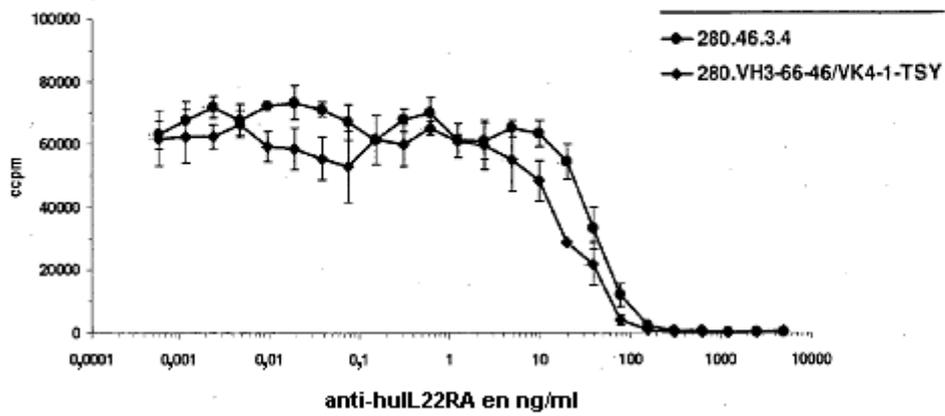
**Figura 20**



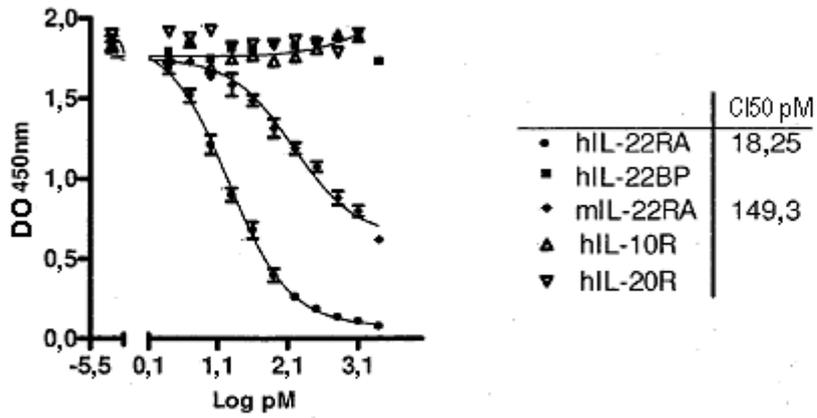
**Figura 21**



**Figura 22**



**Figura 23**



**Figura 24**

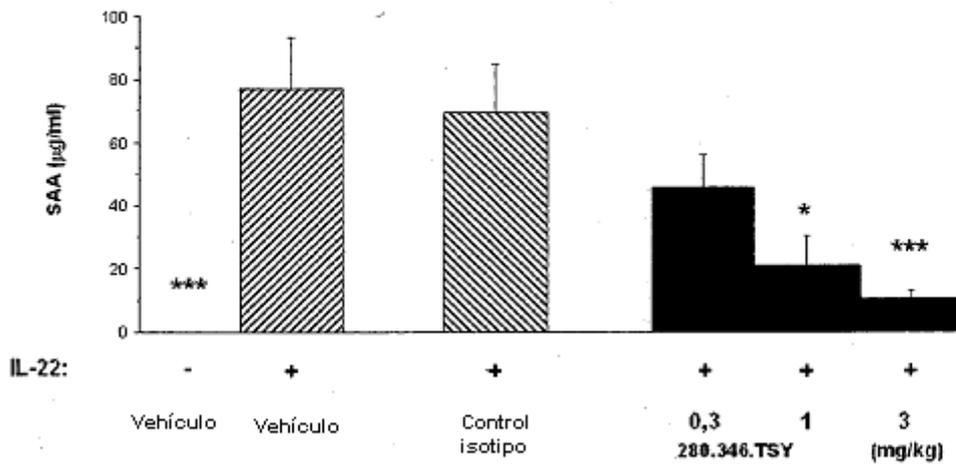


Figura 25

