

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 228**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2005 E 10174725 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2366405**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas de IL-17**

30 Prioridad:

**05.08.2004 GB 0417487**

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

**21.05.2015**

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)  
Lichtstrasse 35  
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DI PADOVA, FRANCO E.;  
GRAM, HERMANN;  
HOFSTETTER, HANS;  
JESCHKE, MARGIT;  
RONDEAU, JEAN-MICHEL y  
VAN DEN BERG, WIM**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 536 228 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 antagonistas de IL-17

Esta invención se refiere a una molécula de unión a IL-17, en particular un anticuerpo contra la IL-17 humana, más preferiblemente un anticuerpo humano contra la IL-17 humana (también denominada IL-17A) y al uso de dichos anticuerpos en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17.

La IL-17, una citoquina derivada de células T presente, por ejemplo, en la artritis reumatoide (RA), actúa como una citoquina proinflamatoria, en particular junto con IL-1 y TNF- $\alpha$  (Chabaud M. y Miossec P. (1999), *Arthritis Rheum.*, 42, 963-970; Awane M. *et al.* (1999), *J. Immunol.*, 162, 5337-5344). La IL-17 induce la producción de MMP e infrarregula a TIMP (Jovanovic D.V. *et al.* (2001), *J. Rheumatol.*, 28, 712-718), y el bloqueo de IL-1 e IL-17 tiene un efecto sinérgico sobre la inflamación y la destrucción ósea *in vivo* (Chabaud M. y Miossec (2001), *Arthritis Rheum.*, 44, 1293-1303). Una producción inapropiada o excesiva de IL-17 está asociada con la patología de diversas enfermedades y trastornos, tales como la artritis reumatoide (Witowski *et al.*, 2004, *Cell Mol. Life Sci.*, 61:567-579), la osteoartritis, el aflojamiento de implantes óseos, el rechazo de trasplantes agudo (Antonysamy *et al.*, 1999, *J. Immunol.*, 162, 577-584; van Kooten *et al.*, 1998, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 9, 1526-1534), la septicemia, el choque séptico o endotóxico, alergias, asma (Molet *et al.*, 2001, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, 430-438), la pérdida ósea, la psoriasis (Teunissen *et al.*, 1998, *J. Invest. Dermatol.*, 111, 645-649), la isquemia, la esclerosis sistémica (Kurasawa *et al.*, 2000, *Arthritis Rheum.*, 43, 2455-2463), el ictus y otros trastornos inflamatorios. Se han propuesto anticuerpos contra IL-17 para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17; véase, por ejemplo, el documento WO 95/18826 y el análisis en su introducción.

Los inventores ahora han preparado anticuerpos contra la IL-17 humana mejorados que son adecuadas para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17.

Además, la molécula de unión a IL-17 para su uso en la presente invención comprende dominios variables de cadena pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ); dicha molécula de unión a IL-17 comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 o sus equivalentes de CDR directos; y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6 o sus equivalentes de CDR directos.

La presente invención proporciona un anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, que comprende dominios variables de cadena pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ) para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple, la espondilitis anquilosante, la artritis psoriática, la artritis reumatoide o la uveítis, en el que dicho anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende:

a) un  $V_H$  que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3, en el que dichas regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Kabat; o

un  $V_H$  que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, teniendo dicha CDR1-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11, teniendo dicha CDR2-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:12, y teniendo dicha CDR3-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13, en el que dichas regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Chothia; y

b) un  $V_L$  que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.

En una realización específica, el anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, para su uso según el párrafo previo, es un anticuerpo humano.

En otra realización, un anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, para su uso según cualquiera de los dos aspectos previos, comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende:

a) un  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos según se muestra en SEQ ID NO:8;

b) un  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos según se muestra en SEQ ID NO:10; o

c) un  $V_H$  que tiene una secuencia de aminoácidos según se muestra en SEQ ID NO:8, y un  $V_L$  que tiene una secuencia de aminoácidos según se muestra en SEQ ID NO:10.

5 En otro aspecto, el anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos activos, para su uso según cualquiera de los aspectos previos, se coadministra, al mismo tiempo o en secuencia, con al menos una segunda sustancia de fármaco seleccionada del grupo que consiste en agentes inmunosupresores, agente inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos o agentes antiinfecciosos.

10 En otro aspecto, el anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos activos, para su uso según cualquiera de los aspectos previos, se coadministra, al mismo tiempo o en secuencia, con sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina, un modulador de la recirculación de linfocitos, por ejemplo, FTY720 y análogos de FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo, rapamicina, 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo, ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato mofetilo; 15-desoxiespergualina.

15 A menos que se indique lo contrario, cualquier cadena polipeptídica se describe en la presente como una secuencia de aminoácidos que comienza en el extremo N-terminal y termina en el extremo C-terminal.

20 Cuando el sitio de unión al antígeno comprende ambos dominios  $V_H$  y  $V_L$ , estos pueden localizarse sobre la misma molécula polipeptídica o, preferiblemente, cada dominio puede estar sobre una cadena diferente, siendo el dominio de  $V_H$  parte de una cadena pesada de inmunoglobulina, o de uno de sus fragmentos, y siendo el  $V_L$  parte de una cadena ligera de inmunoglobulina, o de uno de sus fragmentos.

25 Una "molécula de unión a IL-17" significa cualquier molécula capaz de unirse al antígeno de IL-17 sola o asociada con otras moléculas. La reacción de unión puede demostrarse mediante métodos convencionales (ensayos cualitativos) que incluyen, por ejemplo un ensayo de unión, un ensayo de competición o un bioensayo para determinar la inhibición de la unión de IL-17 a su receptor, o cualquier tipo de ensayo de unión, con referencia a un ensayo de control negativo en el que se emplea un anticuerpo con una especificidad no relacionada, pero del mismo isotipo, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25 (véase también el ejemplo 1).

Los ejemplos de moléculas de unión al antígeno incluyen anticuerpos producidos por célula B o hibridomas, y anticuerpos quiméricos, injertados con CDR o humanos, o cualquier de sus fragmentos, por ejemplo, fragmentos  $F(ab')_2$  y Fab, así como anticuerpos monocatenarios o de un solo dominio.

30 Un anticuerpo monocatenario consiste en los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo unidos covalentemente por un conector peptídico que habitualmente consiste en 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente de 15 a 25 aminoácidos. Por tanto, esta estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesada y ligera, y se cree que un espaciador peptídico pequeño debería ser menos antigénico que una parte constante completa. Un "anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en el que las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera, o ambas, son de origen humano, mientras que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera son de origen no humano (por ejemplo, murino) o tienen un origen humano pero se derivan de un anticuerpo humano diferente. Un "anticuerpo injertado con CDR" significa un anticuerpo en el que las regiones hipervariables (CDR) se derivan de un anticuerpo donante, tal como un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino) o de un anticuerpo humano diferente, mientras que todas las demás partes o sustancialmente todas las demás partes de la inmunoglobulina, por ejemplo, las regiones constantes y las partes altamente conservadas de los dominios variables, es decir, las regiones de marco, se derivan de un anticuerpo aceptor, por ejemplo, un anticuerpo de origen humano. Sin embargo, un anticuerpo injertado con CDR puede contener unos pocos aminoácidos de la secuencia donante en las regiones de marco, por ejemplo, en las partes de las regiones de marco adyacentes a las regiones hipervariables. Un "anticuerpo humano" significa un anticuerpo en el que las regiones constantes y variables de ambas cadenas pesada y ligera son todas de origen humano, o son sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, aunque no necesariamente del mismo anticuerpo, e incluye anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de la parte variable y constante de la inmunoglobulina murina han sido reemplazados por sus homólogos humanos, por ejemplo, tal como se describe en términos generales en los documentos EP 0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 438474 B1 y EP 0 463151 B1.

Las moléculas de unión a IL-17 particularmente preferidas para su uso en la invención son anticuerpos humanos, en especial el anticuerpo AIN457, tal como se describe en la presente a continuación en los ejemplos 1 y 2.

55 Así, en los anticuerpos quiméricos preferidos, los dominios variables de ambas cadenas pesada y ligera son de origen humano, por ejemplo, los del anticuerpo AIN457 que se muestran en SEQ ID NO:10 (= dominio variable de cadena ligera, es decir, aminoácido 1 a 109 de SEQ ID NO:10) y SEQ ID NO:8 (= dominio variable de cadena pesada, es decir, aminoácido 1 a 127 de SEQ ID NO:8). Los dominios de región constante preferiblemente también comprenden dominios de región constante humanos adecuados, por ejemplo, según se describe en "Sequences of

Proteins of Immunological Interest", Kabat E.A. *et al.*, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.

5 Las regiones hipervariables pueden estar asociadas a cualquier tipo de regiones de marco, aunque preferiblemente son de origen humano. Las regiones de marco adecuadas se describen en Kabat E.A. *et al.*, *ibid.* El marco de la cadena pesada preferido es un marco de cadena pesada humano, por ejemplo, el del anticuerpo AIN457. Consiste, en secuencia, por ejemplo, en las regiones FR1 (aminoácido 1 a 30 de SEQ ID NO:8), FR2 (aminoácido 36 a 49 de SEQ ID NO:8), FR3 (aminoácido 67 a 98 de SEQ ID NO:8) y FR4 (aminoácido 117 a 127 de SEQ ID NO:8). Tomando en consideración las regiones hipervariables de AIN457 determinadas mediante un análisis de rayos X, otro marco de cadena pesada preferido consiste, en secuencia, en las regiones FR1-x (aminoácido 1 a 25 de SEQ ID NO:8), FR2-x (aminoácido 36 a 49 de SEQ ID NO:8), FR3-x (aminoácido 61 a 95 de SEQ ID NO:8) y FR4 (aminoácido 119 a 127 de SEQ ID NO:8). De una manera similar, el marco de la cadena ligera consiste, en secuencia, en las regiones FR1' (aminoácido 1 a 23 de SEQ ID NO:10), FR2' (aminoácido 36 a 50 de SEQ ID NO:10), FR3' (aminoácido 58 a 89 de SEQ ID NO:10) y FR4' (aminoácido 99 a 109 de SEQ ID NO:10).

15 Por consiguiente, la invención también proporciona una molécula de unión a IL-17 que comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en SEQ ID NO:8, comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 127, o un primer dominio según se describió anteriormente, y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en SEQ ID NO:10, comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 109.

20 Los anticuerpos monoclonales generados contra una proteína que se encuentra en la naturaleza en todos los seres humanos generalmente se desarrollan en un sistema no humano, por ejemplo, en ratones, y así generalmente son proteínas no humanas. Como consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico, según es producido por un hibridoma, cuando se administra a seres humanos suscita una respuesta inmunológica no deseable que está mediada predominantemente por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto limita claramente el uso de estos anticuerpos, puesto que no puede administrarse a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. Por tanto, se prefiere particularmente emplear anticuerpos monocatenarios, de un solo dominio, quiméricos, injertados con CDR, o especialmente humanos, que no es probable que susciten una respuesta alógena sustancial cuando se administran a seres humanos.

25 Como alternativa, una molécula de unión a IL-17 de la descripción puede seleccionarse de una molécula de unión monocatenaria que comprende un sitio de unión al antígeno que comprende:

30 a) un primer dominio que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, o sus equivalentes de CDR directos, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3; y

35 b) un segundo dominio que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', o sus equivalentes de CDR' directos, teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6; y

40 c) un conector peptídico que está unido al extremo N-terminal del primer dominio y al extremo C-terminal del segundo dominio, o al extremo C-terminal del primer dominio y al extremo N-terminal del segundo dominio.

Tal como se sabe, pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos, tales como una delección, una adición o una sustitución de uno, unos pocos o incluso varios aminoácidos pueden conducir a una forma alélica de la proteína original que tiene propiedades sustancialmente idénticas.

45 Así, la expresión "sus equivalentes de CDR directos" significa moléculas de unión a IL-17 que comprenden, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, y CDR3<sub>i</sub>, (en lugar de CDR1, CDR2, y CDR3), en las que:

(i) la región hipervariable CDR1<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR1 según se muestra en SEQ ID NO:1; y

(ii) la región hipervariable CDR2<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR2 según se muestra en SEQ ID NO:2; y

50 (iii) la región hipervariable CDR3<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR3 según se muestra en SEQ ID NO:3; y

(iv) dicha molécula que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, y CDR3<sub>i</sub> es capaz de inhibir la actividad de 1 nM (= 30 ng/ml) de IL-17 humana a una concentración de 50 nM, preferiblemente de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, más preferiblemente de 5 nM de dicha molécula en 50%, midiéndose dicha actividad inhibidora sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De forma similar, la expresión "sus equivalentes de CDR-x directos" significa moléculas de unión a IL-17 que comprenden, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, y CDR3<sub>i-x</sub>, (en lugar de CDR1-x, CDR2-x, y CDR3-x), en las que:

- 5 (v) la región hipervariable CDR1<sub>i-x</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR1-x según se muestra en SEQ ID NO:11; y
- (vi) la región hipervariable CDR2<sub>i-x</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR2-x según se muestra en SEQ ID NO:12; y
- (vii) la región hipervariable CDR3<sub>i-x</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR3-x según se muestra en SEQ ID NO:13; y
- 10 (viii) dicha molécula que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, y CDR3<sub>i-x</sub> es capaz de inhibir la actividad de 1 nM (= 30 ng/ml) de IL-17 humana a una concentración de 50 nM, preferiblemente de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, más preferiblemente de 5 nM de dicha molécula en 50%, midiéndose dicha actividad inhibidora sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De forma similar, la expresión "sus equivalentes de CDR' directos" significa un dominio que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1'<sub>i</sub>, CDR2'<sub>i</sub>, y CDR3'<sub>i</sub>, en las que:

- 15 (i) la región hipervariable CDR1'<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR1' según se muestra en SEQ ID NO:4; y
- (ii) la región hipervariable CDR2'<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR2' según se muestra en SEQ ID NO:5; y
- 20 (iii) la región hipervariable CDR3'<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR3' según se muestra en SEQ ID NO:6; y
- (iv) dicha molécula que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR'1<sub>i</sub>, CDR'2<sub>i</sub>, y CDR'3<sub>i</sub> es capaz de inhibir la actividad de 1 nM (= 30 ng/ml) de IL-17 humana a una concentración de 50 nM, preferiblemente de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, más preferiblemente de 5 nM de dicha molécula en 50%, midiéndose dicha actividad inhibidora sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

25 Como alternativa, una molécula de unión a IL-17 de la descripción puede ser una molécula de unión a IL-17 que comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V<sub>H</sub>) que comprende, en secuencia:

- a) las regiones hipervariables CDR1 (SEQ ID NO:1), CDR2 (SEQ ID NO:2) y CDR3 (SEQ ID NO:3); o
- 30 b) las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, CDR3<sub>i</sub>, y dicha región hipervariable CDR1<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR1, según se muestra en SEQ ID NO:1, dicha región hipervariable CDR2<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR2, según se muestra en SEQ ID NO:2; y dicha región hipervariable CDR3<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR3, según se muestra en SEQ ID NO:3; y

35 dicha molécula de unión a IL-17 que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>x</sub>, CDR2<sub>x</sub>, y CDR3<sub>x</sub> es capaz de inhibir la actividad de 1 nM (= 30 ng/ml) de IL-17 humana a una concentración de 50 nM, preferiblemente de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, más preferiblemente de 5 nM de dicha molécula en 50%, midiéndose dicha actividad inhibidora sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

40 De forma similar, una molécula de unión a IL-17 de la descripción puede ser una molécula de unión a IL-17 que comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V<sub>H</sub>) que comprende, en secuencia:

- a) las regiones hipervariables CDR1-x (SEQ ID NO:11), CDR2-x (SEQ ID NO:12) y CDR3-x (SEQ ID NO:13); o
- 45 b) las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, CDR3<sub>i-x</sub> y dicha región hipervariable CDR1<sub>i-x</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR1-x, según se muestra en SEQ ID NO:11, dicha región hipervariable CDR2<sub>i-x</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR2-x, según se muestra en SEQ ID NO:12; y dicha región hipervariable CDR3<sub>i-x</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR3-x, según se muestra en SEQ ID NO:13; y

50 dicha molécula de unión a IL-17 que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, y CDR3<sub>i-x</sub> es capaz de inhibir la actividad de 1 nM (= 30 ng/ml) de IL-17 humana a una concentración de 50 nM,

preferiblemente de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, más preferiblemente de 5 nM de dicha molécula en 50%, midiéndose dicha actividad inhibidora sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

5 De forma similar, una molécula de unión a IL-17 de la descripción puede ser una molécula de unión a IL-17 que comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende al menos un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que comprende, en secuencia:

a) las regiones hipervariables CDR'1 (SEQ ID NO:4), CDR'2 (SEQ ID NO:5), y CDR'3 (SEQ ID NO:6); o

10 b) las regiones hipervariables CDR'1<sub>i</sub>, CDR'2<sub>i</sub>, CDR'3<sub>i</sub>, y dicha región hipervariable CDR'1<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR'1, según se muestra en SEQ ID NO:4, dicha región hipervariable CDR'2<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR'2, según se muestra en SEQ ID NO:5; y dicha región hipervariable CDR'3<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR'3, según se muestra en SEQ ID NO:6; y

15 dicha molécula de unión a IL-17 que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR'1<sub>i</sub>, CDR'2<sub>i</sub>, y CDR'3<sub>i</sub> es capaz de inhibir la actividad de 1 nM (= 30 ng/ml) de IL-17 humana a una concentración de 50 nM, preferiblemente de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, más preferiblemente de 5 nM de dicha molécula en 50%, midiéndose dicha actividad inhibidora sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

20 Como alternativa, una molécula de unión a IL-17 de la descripción puede ser una molécula de unión a IL-17 que comprende ambos dominios variables de cadena pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ), y dicha molécula de unión a IL-17 comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1 (SEQ ID NO:1), CDR2 (SEQ ID NO:2) y CDR3 (SEQ ID NO:3); y

25 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR'1 (SEQ ID NO:4), CDR'2 (SEQ ID NO:5) y CDR'3 (SEQ ID NO:6); o

30 b) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, y CDR3<sub>i</sub>, y dicha región hipervariable CDR1<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR1, según se muestra en SEQ ID NO:1, dicha región hipervariable CDR2<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR2, según se muestra en SEQ ID NO:2; y dicha región hipervariable CDR3<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR3, según se muestra en SEQ ID NO:3; y

35 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1'<sub>i</sub>, CDR2'<sub>i</sub>, CDR3'<sub>i</sub>, y dicha región hipervariable CDR'1<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR'1, según se muestra en SEQ ID NO:4, dicha región hipervariable CDR'2<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR'2, según se muestra en SEQ ID NO:5; y dicha región hipervariable CDR'3<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR'3, según se muestra en SEQ ID NO:6; y

40 dicha molécula de unión a IL-17 definida en b) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, CDR3<sub>i</sub>, CDR'1<sub>i</sub>, CDR'2<sub>i</sub>, y CDR'3<sub>i</sub> es capaz de inhibir la actividad de 1 nM (= 30 ng/ml) de IL-17 humana a una concentración de 50 nM, preferiblemente de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, más preferiblemente de 5 nM de dicha molécula en 50%, midiéndose dicha actividad inhibidora sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

45 Como alternativa, una molécula de unión a IL-17 de la descripción puede ser una molécula de unión a IL-17 que comprende ambos dominios variables de cadena pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ), y dicha molécula de unión a IL-17 comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1-x (SEQ ID NO:11), CDR2-x (SEQ ID NO:12) y CDR3-x (SEQ ID NO:13); y

50 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR'1 (SEQ ID NO:4), CDR'2 (SEQ ID NO:5) y CDR'3 (SEQ ID NO:6); o

b) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, y CDR3<sub>i-x</sub>, y dicha región hipervariable CDR1<sub>i-x</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR1-x, según se muestra en

SEQ ID NO:11, dicha región hipervariable CDR2-x se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR2-x, según se muestra en SEQ ID NO:12; y dicha región hipervariable CDR3-x se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR3-x, según se muestra en SEQ ID NO:13; y

- 5 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, CDR3<sub>i</sub>, y dicha región hipervariable CDR'1<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR'1, según se muestra en SEQ ID NO:4, dicha región hipervariable CDR'2<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR'2, según se muestra en SEQ ID NO:5; y dicha región hipervariable CDR'3<sub>i</sub> se diferencia en 3, preferiblemente en 2, más preferiblemente en 1 aminoácido o aminoácidos de la región hipervariable CDR'3, según se muestra en SEQ ID NO:6; y

10 dicha molécula de unión a IL-17 definida en b) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, CDR3<sub>i</sub>, CDR'1<sub>i</sub>, CDR'2<sub>i</sub>, y CDR'3<sub>i</sub> es capaz de inhibir la actividad de 1 nM (= 30 ng/ml) de IL-17 humana a una concentración de 50 nM, preferiblemente de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, más preferiblemente de 5 nM de dicha molécula en 50%, midiéndose dicha actividad inhibidora sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

15 La inhibición de la unión de IL-17 a su receptor puede ensayarse de modo conveniente con diversos ensayos, que incluyen los ensayos descritos a continuación en la presente en el texto. La expresión "en el mismo grado" significa que la referencia y las moléculas equivalentes muestran, sobre una base estadística, una actividad inhibidora de IL-17 fundamentalmente idéntica en uno de los ensayos mencionados en la presente (véase el ejemplo 1). Por ejemplo, las moléculas de unión a IL-17 de la invención generalmente tienen unas IC<sub>50</sub> para la inhibición de la IL-17 humana sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17 humana en fibroblastos dérmicos humanos que está dentro de +/-x5, es decir, por debajo de 10 nM, más preferiblemente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 nM, o preferiblemente casi la misma que la IC<sub>50</sub> de la correspondiente molécula de referencia, cuando se ensayan según se describe en el ejemplo 1.

20 Como alternativa, el ensayo empleado puede ser un ensayo de inhibición competitiva de la unión de IL-17 por receptores de IL-17 solubles (por ejemplo, las construcciones de IL-17 R humana/Fc del ejemplo 1) y las moléculas de unión a IL-17 de la invención.

Lo más preferiblemente, el anticuerpo de IL-17 humana comprende, al menos:

- 30 a) una cadena pesada que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en SEQ ID NO:8, comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 127, y la parte constante de una cadena pesada humana; y
- b) una cadena ligera que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en SEQ ID NO:10, comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 109, y la parte constante de una cadena ligera humana.

35 La parte constante de una cadena pesada humana puede ser de tipo  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_4$ ,  $\mu$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$ , preferiblemente de tipo  $\gamma$ , más preferiblemente de tipo  $\gamma_1$ , mientras que la parte constante de una cadena ligera humana puede ser de tipo  $\kappa$  o  $\lambda$  (que incluyen los subtipos  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  y  $\lambda_3$ ), pero preferiblemente es de tipo  $\kappa$ . Las secuencias de aminoácidos de todas estas partes constantes se indican en Kabat *et al.* (supra).

- 40 Los conjugados de las moléculas de unión de la invención, por ejemplo, conjugados de enzimas, toxinas o radioisótopos, también se incluyen dentro del alcance de la invención.

45 Un "polipéptido", si no se especifica de otro modo en la presente, incluye cualquier péptido o proteína que comprende aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, y que tiene una secuencia de aminoácidos que comienza en el extremo N-terminal y termina en el extremo C-terminal. Preferiblemente, el polipéptido de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, más preferiblemente es un anticuerpo monoclonal quimérico (también denominado injertado con V) o humanizado (también denominado injertado con CDR), y lo más preferiblemente es un anticuerpo totalmente humano que puede obtenerse, por ejemplo, mediante la tecnología ejemplificada en el ejemplo 1. El anticuerpo monoclonal humanizado (injetado con CDR) o totalmente humano puede o no incluir otras mutaciones introducidas dentro de las secuencias de marco (FR) del anticuerpo aceptor.

- 50 Un derivado funcional de un polipéptido, tal como se emplea en la presente, incluye una molécula que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un polipéptido de la presente invención, es decir, tiene la capacidad para unirse a la IL-17 humana. Un derivado funcional incluye fragmentos y análogos peptídicos de un polipéptido según la presente invención. Los fragmentos comprenden regiones dentro de la secuencia de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. El término "derivado" se emplea para definir
- 55 variantes de secuencia de aminoácidos y las modificaciones covalentes de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Los derivados funcionales de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, por ejemplo, de la región hipervariable de la

cadena ligera y pesada, preferiblemente tienen al menos aproximadamente 65%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95, 96, 97, 98, 99% de homología global de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, y conservan sustancialmente la capacidad de unirse a la IL-17 humana o, por ejemplo, neutralizar la producción de IL-6 de fibroblastos dérmicos humanos inducida por IL-17.

La expresión "modificación covalente" incluye modificaciones de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, o de uno de sus fragmentos, con un agente derivatizante proteico o no proteico orgánico, fusiones con secuencias polipeptídicas heterólogas, y modificaciones postraduccionales. Los polipéptidos con modificación covalente, por ejemplo, de una secuencia especificada, aún conservan la capacidad de unirse a la IL-17 humana o, por ejemplo, neutralizar la producción de IL-6 de fibroblastos dérmicos humanos inducida por IL-17 mediante entrecruzamiento. Las modificaciones covalentes se introducen tradicionalmente haciendo reaccionar restos aminoácidos concretos con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con restos laterales o terminales seleccionados, o utilizando mecanismos de modificaciones postraduccionales que actúan en células hospedantes recombinantes seleccionadas. Ciertas modificaciones postraduccionales son el resultado de la acción de células hospedantes recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los restos glutamilo y asparaginilo con frecuencia son desamidados postraduccionalmente para producir los correspondientes restos glutamilo y aspartilo. Como alternativa, estos restos se desaminan bajo condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo, tirosina o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina; véase, por ejemplo, T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983). Las modificaciones covalentes incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión que comprenden un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, y sus variantes de secuencia de aminoácidos, tales como inmunoadhesinas, y fusiones N-terminales con secuencias señal heterólogas.

La "homología" con respecto a un polipéptido nativo y su derivado funcional se define en la presente como el porcentaje de restos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos de un correspondiente polipéptido nativo, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología, y no considerando ninguna de las sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencia. No debe considerarse que las inserciones o las extensiones N- o C-terminales reduzcan la identidad o la homología. Los métodos y los programas informáticos para el alineamiento son muy conocidos.

Un "aminoácido o aminoácidos" se refieren a todos los L- $\alpha$ -aminoácidos naturales, por ejemplo, e incluyen los D-aminoácidos. Los aminoácidos se identifican mediante sus conocidas denominaciones de una sola letra o de tres letras.

La expresión "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos, comparadas con un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Los variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, aún conservan la capacidad de unirse a la IL-17 humana o, por ejemplo, de neutralizar la producción de IL-6 de fibroblastos dérmicos humanos inducida por IL-17. Los variantes de sustitución son los variantes en los que se ha eliminado al menos un resto aminoácido y se ha insertado un aminoácido diferente en su lugar en la misma posición en un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Estas sustituciones pueden ser únicas, en las que solo se ha sustituido un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, en la que se han sustituido dos o más aminoácidos en la misma molécula. Los variantes de inserción son los variantes en los que uno o más aminoácidos se insertan inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición concreta en un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado al grupo funcional  $\alpha$ -carboxi o  $\alpha$ -amino del aminoácido. Los variantes de delección son los variantes en los que se han eliminado uno o más aminoácidos en un polipéptido según la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. Normalmente, los variantes de delección tendrán uno o dos aminoácidos deleccionados en una región concreta de la molécula.

Una molécula de unión a IL-17 de la invención puede producirse mediante técnicas de ADN recombinante. A la vista de esto, deben construirse una o más moléculas de ADN que codifican la molécula de unión, colocarse bajo el control de secuencia apropiadas y transferirse en un organismo hospedante adecuado para la expresión.

Por consiguiente, de una manera muy general se proporcionan:

- (i) moléculas de ADN que codifican una molécula de unión a IL-17 monocatenaria de la invención, una molécula de unión a IL-17 que comprende una cadena pesada y ligera según se define en la presente, o fragmentos de una molécula de unión a IL-17 de la invención; y
- (ii) el uso de las moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula de unión a IL-17 de la invención por medios recombinantes.

Por consiguiente, la descripción proporciona una molécula de ADN que codifica una molécula de unión a IL-17 según se describió anteriormente.

Además, la descripción describe una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que es sustancialmente homóloga a SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9.

- 5 Además, la invención describe una construcción de ADN que comprende dos moléculas de ADN, de las cuales una es sustancialmente homóloga a SEQ ID NO:7, y la otra es sustancialmente homóloga a SEQ ID NO:9.

En el presente estado de la técnica, los expertos en la técnica serán capaces de sintetizar las moléculas de ADN de la invención con la información proporcionada en la presente, es decir, las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables y las secuencias de ADN que las codifican. Un método para construir un gen de dominio variable se describe, por ejemplo, en el documento EPA 239 400, y puede resumirse brevemente como sigue: Se clona un gen que codifica un dominio variable de un MAb de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifican las regiones de marco e hipervariables, y los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables se retiran de modo que los segmentos de ADN que codifican las regiones de marco están unidos entre sí con sitios de restricción apropiados en las uniones. Los sitios de restricción pueden generarse en las posiciones apropiadas mediante mutagénesis de la molécula de ADN mediante procedimientos convencionales. Se preparan módulos de CDR sintéticos bicatenarios mediante síntesis de ADN según las secuencias que codifican SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2), SEQ ID NO:3 (CDR3), SEQ ID NO:4 (CDR1'), SEQ ID NO:5 (CDR2'), SEQ ID NO:6 (CDR6'), SEQ ID NO:11 (CDR1-x), SEQ ID NO:12 (CDR2-x), SEQ ID NO:13 (CDR3-x). Estos módulos se proporcionan con extremos pegajosos para que puedan acoplarse en las uniones del marco.

20 Además, no es necesario tener acceso al ARNm producido por una línea de células de hibridoma productoras para obtener una construcción de ADN que codifique las moléculas de unión a IL-17 de la invención. Así, la solicitud PCT WO 90/07861 ofrece instrucciones completas para la producción de un anticuerpo mediante técnicas de ADN recombinante con solo la información escrita acerca de la secuencia de nucleótidos del gen. El método comprende la síntesis de una serie de oligonucleótidos, su amplificación mediante el método de PCR, y su corte para producir la secuencia de ADN deseada.

Los vectores de expresión que comprenden un promotor adecuado o genes que codifican las partes constantes de cadena pesada y ligera están públicamente disponibles. Así, tras preparar una molécula de ADN de la invención, esta puede transferirse de modo conveniente en un vector de expresión apropiado. Las moléculas de ADN que codifican anticuerpos monocatenarios también pueden prepararse mediante métodos convencionales, por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 88/1649.

Preferiblemente, esta segunda construcción de ADN codifica un dominio variable que comprende restiones de marco e hipervariables alternantes, y dichas regiones hipervariables son, en secuencia, CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6. Más preferiblemente, esta primera parte de la segunda construcción de ADN codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO:10, comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 109. Más preferiblemente, la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO:9, comenzando con el nucleótido en la posición 1 y terminando con el nucleótido en la posición 327. También preferiblemente, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena ligera humana, más preferiblemente la parte constante de  $\kappa$  humana.

Preferiblemente, la primera y la segunda construcción de ADN se emplearán juntas, pero también pueden emplearse por separado.

La invención también incluye moléculas de unión a IL-17 en las que uno o más de los restos aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR1-x, CDR2-x, CDR3-x, CDR1', CDR2' o CDR3' o de los marcos, generalmente solo unos pocos (por ejemplo, 1-4), están cambiados, por ejemplo, mediante mutación, tal como mutagénesis dirigida específica de sitio de las correspondientes secuencias de ADN. La invención incluye las secuencias de ADN que codifican estas moléculas de unión a IL-17 cambiadas. En particular, la invención incluye moléculas de unión a IL-17 en las que uno o más restos de CDR1' o CDR2' se han cambiado con respecto a los restos que aparecen en SEQ ID NO:4 (para CDR1') y SEQ ID NO:5 (para CDR2').

50 En la primera y la segunda construcción de ADN, la primera y la segunda parte pueden estar separadas por un intrón, y un potenciador puede estar localizado de modo conveniente en el intrón entre la primera y la segunda parte. La presencia de este potenciador, que se transcribe pero no se traduce, puede ayudar a conseguir una transcripción eficaz. En realizaciones concretas, la primera y la segunda construcción de ADN comprende el potenciador de un gen de cadena pesada, de forma ventajosa de origen humano.

55 Cada una de las construcciones de ADN se coloca bajo el control de secuencias de control adecuadas, en particular bajo el control de un promotor adecuado. Puede emplearse cualquier tipo de promotor, con la condición de que esté adaptado para el organismo hospedante en el que se transfieren las construcciones de ADN para la expresión.

5 El anticuerpo deseado puede ser producido en un cultivo celular o en un animal transgénico. Un animal transgénico adecuado puede obtenerse según métodos convencionales, que incluyen la microinyección en óvulos de la primera y la segunda construcción de ADN que se han colocado bajo el control de secuencias adecuadas, la transferencia de los óvulos preparados de esta manera a hembras pseudopreñadas, y la selección de un descendiente que exprese el anticuerpo deseado.

Cuando las cadenas de anticuerpos se producen en un cultivo celular, las construcciones de ADN primero deben insertarse en un único vector de expresión o en dos vectores de expresión distintos, pero compatibles, siendo preferida esta última posibilidad.

10 Por consiguiente, la invención también describe un vector de expresión capaz de replicarse en una línea de células procariontas o eucariontas que comprende al menos una de las construcciones de ADN descritas anteriormente.

15 Cada vector de expresión que contiene una construcción de ADN después se transfiere en un organismo hospedante adecuado. Cuando las construcciones de ADN se insertan por separado en dos vectores de expresión, estas pueden transferirse por separado, es decir, un tipo de vector por célula, o cotransferirse, siendo preferida esta última posibilidad. Un organismo hospedante adecuado puede ser una bacteria, una levadura o una línea celular de mamífero, siendo preferida esta última posibilidad. Más preferiblemente, la línea celular de mamífero es de origen linfocítico, por ejemplo, un mieloma, hibridoma o células B inmortalizadas normales, que de modo conveniente no expresan ninguna cadena pesada o ligera de anticuerpo endógena.

20 Para la expresión en células de mamífero se prefiere que la secuencia codificadora de la molécula de unión a IL-17 se integre en el ADN de la célula hospedante dentro de un locus que permita o favorezca un alto nivel de expresión de la molécula de unión a IL-17. Las células en las que la secuencia codificadora de la molécula de unión a IL-17 está integrada en estos loci favorables pueden identificarse y seleccionarse basándose en los niveles de la molécula de unión a IL-17 que expresan. Puede emplearse cualquier marcador seleccionable adecuado para la preparación de las células hospedantes que contienen la secuencia codificadora de la molécula de unión a IL-17; por ejemplo, puede emplearse un sistema de gen dhfr/metotrexato o un sistema de selección equivalente. Los sistemas alternativos para la expresión de las moléculas de unión a IL-17 de la invención incluyen sistemas de selección/amplificación basados en GS, tales como los descritos en los documentos EP 0256055 B, EP 0323997 B y en la solicitud de patente europea 89303964.4.

25 También se describe un proceso para el producto de una molécula de unión a IL-17 que comprende (i) cultivar un organismo que está transformado con un vector de expresión como se definió anteriormente, y (ii) recuperar la molécula de unión a IL-17 del cultivo.

30 Para los objetivos de la presente descripción, un anticuerpo es "capaz de inhibir la unión de IL-17 como AIN457" si el anticuerpo es capaz de inhibir la unión de IL-17 a su receptor sustancialmente en el mismo grado que el anticuerpo AIN457, en el que "en el mismo grado" tiene el significado definido anteriormente.

35 El anticuerpo AIN457 presenta una afinidad de unión por IL-17 que es mayor que las afinidades previamente indicadas para anticuerpos anti-IL-17, en particular para cualquier anticuerpo anti-IL-17 humana. Así, AIN457 tiene una constante de disociación en equilibrio  $K_D$  para la unión a IL-17 de aproximadamente  $0,188 \pm 0,036$  nM (determinada mediante BIAcore, por ejemplo, como se muestra en el ejemplo 2). Esta alta afinidad de unión hace que el anticuerpo AIN457 sea particularmente adecuado para aplicaciones terapéuticas.

40 En la presente descripción, la expresión "enfermedad mediada por IL-17" incluye todas las enfermedades y los trastornos médicos en los que la IL-17 desempeña un papel, directa o indirectamente, en la enfermedad o el trastorno médico, que incluyen la causa, el desarrollo, el avance, la persistencia o la patología de la enfermedad o el trastorno.

45 En la presente descripción, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren ambos al tratamiento profiláctico o preventivo, así como al tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, que incluye el tratamiento de un paciente en riesgo de contraer la enfermedad o que es sospechoso de haber contraído la enfermedad, así como los pacientes que están enfermos o que han sido diagnosticados como que padecen una enfermedad o un trastorno médico, e incluye la supresión de la recaída clínica.

50 Las moléculas de unión a IL-17, según se definieron anteriormente, que presentan especificidad de unión por la IL-17 humana, en particular anticuerpos que son capaces de inhibir la unión de IL-17 a su receptor; y los anticuerpos contra IL-17 que son capaces de inhibir la actividad de 1 nM (= 30 ng/ml) de IL-17 humana a una concentración de 50 nM, preferiblemente de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, más preferiblemente de 5 nM de dicha molécula en 50%, midiéndose dicha actividad inhibitoria sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos, se denominan en la presente los anticuerpos de la invención.

55 Preferiblemente, los anticuerpos para su uso en la invención son anticuerpos humanos, lo más preferiblemente el anticuerpo AIN457.

Los anticuerpos de la invención bloquean los efectos de IL-17 sobre sus células diana y, así, están indicados para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17. Estas y otras actividades farmacológicas de los anticuerpos de la invención pueden demostrarse en métodos de ensayo convencionales, por ejemplo, como se describe a continuación:

- 5 *Neutralización de la producción de interleuquina-6 por fibroblastos humanos primarios dependiente de IL-17:* La producción de IL-6 en fibroblastos (dérmicos) humanos primarios depende de la IL-17 (Hwang S.Y. *et al.*, (2004) *Arthritis Res. Ther.*, 6:R120-128.

10 Brevemente, se estimulan fibroblastos dérmicos humanos con IL-17 recombinante en presencia de diversas concentraciones del anticuerpo de la invención o receptor de IL-17 humana con la parte Fc. Se emplea el anticuerpo quimérico anti-CD25 Simulect® (basiliximab) como control negativo. El sobrenadante se recoge después de 16 h de estimulación y se ensaya para IL-6 mediante ELISA. Los anticuerpos de la invención generalmente tienen unas IC<sub>50</sub> para la inhibición de la producción de IL-6 (en presencia de IL-17 humana 1 nM) de aproximadamente 50 nM o menor (por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 nM) cuando se ensayan como se indicó anteriormente, es decir, dicha actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención tienen una IC<sub>50</sub> para la inhibición de la producción de IL-6, según se definió anteriormente, de aproximadamente 20 nM o menor, más preferiblemente de aproximadamente 10 nM o menor, más preferiblemente de aproximadamente 5 nM o menor, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM o menor, más preferiblemente de aproximadamente 1 nM o menor.

20 Tal como se indicó anteriormente, los anticuerpos de la invención bloquean potentemente los efectos de la IL-17. Por consiguiente, los anticuerpos de la invención tienen la siguiente utilidad farmacéutica:

Los anticuerpos de la invención son útiles para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades o trastornos médicos mediados por IL-17, por ejemplo, trastornos inflamatorios, alergias y trastornos alérgicos, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunitarias, infecciones graves, y rechazo de trasplantes de órganos o de tejidos.

25 Los anticuerpos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento de la espondilitis anquilosante.

30 Por supuesto, la dosificación apropiada variará dependiendo, por ejemplo, del anticuerpo de la invención concreto que se va a emplear, el hospedante, el modo de administración, y la naturaleza y la gravedad del trastorno que se está tratando. Sin embargo, en un uso profiláctico, generalmente se indica la obtención de unos resultados satisfactorios a unas dosificaciones de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal, más habitualmente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal. La frecuencia de la dosificación para usos profilácticos normalmente estará en el intervalo de aproximadamente una vez semanal hasta aproximadamente una vez cada 3 meses, más habitualmente en el intervalo de aproximadamente una vez cada 2 semanas hasta una vez cada 10 semanas, por ejemplo, una vez cada 4 a 8 semanas. El anticuerpo de la invención se administra de modo conveniente por vía parenteral, intravenosa, por ejemplo, en la vena antecubital u otra vena periférica, por vía intramuscular o subcutánea. Un tratamiento profiláctico generalmente comprende administrar el anticuerpo de la invención desde una vez mensual a una vez cada 2 a 3 meses, o con menos frecuencia.

40 Los anticuerpos para su uso en la invención pueden administrarse como el único ingrediente activo, o en conjunción, por ejemplo, como un adyuvante, o en combinación con otros fármacos, por ejemplo, agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, otros agentes antiinflamatorios o agentes antiinfecciosos, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en combinación con DMARD, por ejemplo, sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina, un modulador de la recirculación de linfocitos, por ejemplo, FTY720 y análogos de FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo, rapamicina, 40-O-(2-hidroxiethyl)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo, ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato mofetilo; 15-desoxiespergualina, o uno de sus derivados, análogos u homólogos inmunosupresores.

50 Cuando los anticuerpos de la invención se administran en conjunción con otra terapia inmunosupresora/inmunomoduladora, antiinflamatoria, quimioterapéutica o antiinfecciosa, las dosificaciones del compuesto de combinación coadministrado variarán, por supuesto, dependiendo del tipo de cofármaco empleado, por ejemplo, si es un DMARD, anti-TNF, bloqueante de IL-1 u otros, del fármaco específico empleado, del trastorno que se está tratando, etc.

55 Las composiciones farmacéuticas empleadas en la invención pueden fabricarse de una manera convencional. Una composición empleada en la invención se proporciona preferiblemente en forma liofilizada. Para la administración inmediata se disuelve en un vehículo acuoso adecuado, por ejemplo, agua estéril para inyección o disolución salina fisiológica tamponada estéril. Si se considera deseable constituir una disolución de un volumen mayor para la administración mediante infusión, en lugar de una inyección en embolada, resulta ventajoso incorporar albúmina de

suero humana o la propia sangre del paciente heparinizada en la disolución salina en el momento de la formulación. Como alternativa, la formulación se administra por vía subcutánea. La presencia de un exceso de estas proteínas fisiológicamente inertes evita la pérdida del anticuerpo por adsorción sobre las paredes del recipiente y los tubos empleados con la disolución de infusión. Se si emplea albúmina, una concentración adecuada es del 0,5% al 4,5% en peso de la disolución salina. Otras formulaciones comprenden una formulación líquida o liofilizada.

La invención se describe a continuación como ilustración en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Se emplean ratones transgénicos modificados para que expresen el repertorio de IgG/k humanas, en lugar del repertorio de inmunoglobulinas murinas (Fishwild *et al.*, 1996, Nat. Biotechnol., 14, 845-851) para generar anticuerpos contra la IL-17 humana. Se immortalizan células B de estos ratones mediante la tecnología del hibridoma convencional y se obtienen células de hibridoma murino que segregan el anticuerpo AIN457 de IgG1/k humana.

#### Ejemplo 1: Generación del hibridoma, purificación de los anticuerpos, selección del anticuerpo AIN457

*Producción de IL-17 humana recombinante (hulL-17):* La hulL-17 recombinante se produce en cuerpos de inclusión de *E. coli* y se vuelve a plegar mediante técnicas convencionales (sin vehículo, producidas en el laboratorio de los inventores (*E. coli*; Novartis Pharma, lote BM-E3141/98) o se adquirieron en el mercado (sin vehículo, *E. coli*; R&D Systems n.º 317-IL/CF)) o como una proteína segregada y parcialmente glicosilada en HEK.EBNA (hulL-17 recombinante, sin vehículo (IL-17 APP-C6 de células HEK/EBNA transfectadas; Novartis Pharma, lote En.E-3382/82; 0,28 mg/ml; hulL-17 recombinante, sin vehículo (IL-17 APP-C4 de células HEK/EBNA transfectadas; Novartis Pharma, lote En.E-3382/83; 0,29 mg/ml)). Esta última forma incluye una extensión de 4 aminoácidos C-terminal para la purificación rápida de los sobrenadantes del cultivo mediante una cromatografía de inmunoafinidad. En este caso, los sobrenadantes del cultivo se cargan sobre una columna con el tamaño apropiado con un anticuerpo antimarcador inmovilizado específico, acoplado a Sepharose 4B activada con CNBr, a una densidad de 10 mg/ml de resina, siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia). Después del lavado de la línea de base con PBS, la hulL-17 unida se eluye con glicina 100 mM, pH 2,7 e inmediatamente se neutraliza con NaOH diluido.

*Acomplamiento de hulL-17 a hemocianina de lapa (KLH):* La hulL-17 producida en *E. coli* o HEK.EBNA se acopla a KLH preactivada con un exceso del reticulante homobifuncional suberato de disuccinimidilo (DSS). Brevemente, se reconstituyen 20 mg de Imject® Mariculture KLH (Pierce n.º 77600) liofilizado con 2 ml de H<sub>2</sub>O para obtener una disolución de 10 mg/ml que contiene disolución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2. A esta disolución se le añaden 400 µl de DSS 250 mM en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y la mezcla se agita durante aproximadamente 1 hr a temperatura ambiente (no se disuelve todo el reactivo y se forma algo de precipitado). Después de una breve centrifugación y filtración (0,45 µm), la disolución después se desala en Sephadex G25 fino (Pharmacia) en PBS (caudal de 2 ml/min), produciendo aproximadamente 11 mg de KLH activada a 1,5 mg/ml (Bradford). Se mezcla 1 ml de la KLH activada (1,5 mg) con 1 ml de una disolución 9 mg/ml en agua de hulL-17 derivada de *E. coli* liofilizada (lote BM-E3141/98). La disolución sigue siendo transparente y se incuba durante 2 hr a temperatura ambiente. La concentración del complejo resultante es de 1,4 mg/ml (medida por Bradford). Se mezcla 1 ml de la KLH activada (1,5 mg) con 1 ml de hulL-17 de HEK.EBNA (aproximadamente 3 mg en agua; lote En.E-3382/83). La disolución sigue siendo transparente y se incuba durante 2 hr a temperatura ambiente. La concentración (Bradford) es de 2,9 mg/ml.

*Immunización:* Un ratón genéticamente modificado 27340 (hembra; MEDAREX Inc, Annandale, NJ), en el que los genes de la parte variable y constante de inmunoglobulina murina están funcionalmente reemplazados por sus homólogos humanos (código Tg de genotipo 221100-TgH (CMD)++;TgN(Hco7)11952+; TgH(JKD)++; TgN(KCO5)9272+ (véase también Sherie L. Morrison, 1994, Nature, vol. 368, p. 812-813; Nils Lonberg *et al.*, 1994, Nature, vol. 368, p. 856-859) se inmuniza siguiente el esquema indicado en la tabla 1.

**Tabla 1. Programa de inmunización**

Día	Fecha	Inmunógeno	Dosis y vía de inmunización
0	07.06.01	HulL-17 (BM-E3141/98) acoplado con KLH mezclado 1:1 con hulL-17 (BM-E3141/98) en adyuvante de Gerbu	25 µg de cada s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
14	21.06.01 (1 <sup>er</sup> refuerzo)	HulL-17 (BM-E3141/98) acoplado con KLH mezclado 1:1 con hulL-17 (En.E-3382/83) acoplado con KLH en adyuvante de Gerbu	25 µg de cada s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
28	05.07.01 (2 <sup>o</sup> refuerzo)	HulL-17 (BM-E3141/98) mezclado 1:1 con hulL-17 (En.E-3382/83) en adyuvante de Gerbu	10 µg de cada s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl

35	12.07.01		suero recogido para ELISA
42	19.07.01 (3 <sup>er</sup> refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) mezclado 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) acoplado con KLH en adyuvante de Gerbu	20 µg de cada s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
63	09.08.01 (4 <sup>o</sup> refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) acoplado con KLH mezclado 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) acoplado con KLH en adyuvante de Gerbu	20 µg de cada s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
91	06.09.01 (5 <sup>o</sup> refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) mezclado 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) en adyuvante de Gerbu	20 µg de cada s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
99	14.09.01		suero recogido para ELISA
117	02.10.01	HuL-17 (En.E-3382/83)	10 µg/ratón i.v.
		HuL-17 (En.E-3382/83) acoplado con KLH	10 µg/ratón i.p.
118	03.10.01	HuL-17 (En.E-3382/83) acoplado con KLH	10 µg/ratón i.p.
119	04.10.01	HuL-17 (En.E-3382/83) acoplado con KLH	10 µg/ratón i.p.
120	05.10.01	fusión	

Las muestras de suero se obtienen 35 y 99 días después del inicio del protocolo de inmunización para medir los niveles del anticuerpo anti-huL17 mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

- 5 *Generación de hibridomas:* En el día 120, el ratón 27340 se sacrifica mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Las células esplénicas totales (1 x 10<sup>8</sup>) se fusionan con células PAI-0 (5 x 10<sup>7</sup> células) empleando PEG 4000. Las células fusionadas se cultivan en placas de 720 pocillos (1 ml/pocillo), que contienen una capa de alimentación de células peritoneales de ratón (ratones Balb/c), en medio HAT (RPMI 1640 que contiene bicarbonato de sodio 2 g/l, β-mercaptoetanol 5 x 10<sup>-5</sup> M, hipoxantina 10<sup>-4</sup> M, timidina 1,6 x 10<sup>-5</sup> M, aminopterina 4 x 10<sup>-7</sup> M, FCS termoinactivado al 10%, y gentamicina 50 µg/ml). En el día 14, el medio HAT se intercambia por medio HT, es decir, medio HAT sin aminopterina. La selección comienza en el día 10, y dura dos semanas. De los 720 pocillos iniciales cultivados, 684 pocillos (95%) son positivos para el crecimiento del hibridoma. Los sobrenadantes se recogen y se seleccionan para MAb reactivos a huL-17 en ELISA empleando huL-17 derivada de *E. coli* y de HEK/EBNA. Cincuenta y dos pocillos primarios puntuaron positivo para la presencia de anticuerpos anti-huL-17. Se clonaron 28 hibridomas y el resto se congelaron. La clonación se realiza en 4 x placas de microtitulación de 96 pocillos, en medio HT y una capa de alimentación de células peritoneales de ratón. Los hibridomas se cultivan en placa a 0,5 células/100 µl por pocillo. Los pocillos se seleccionan al microscopio para el crecimiento y los positivos se alimentan con 100 µl de medio HT. Al día siguiente, los sobrenadantes se ensayan para la producción de anticuerpos en un ELISA específico de huL-17. Después de la clonación, la mayoría de los hibridomas clonados mantienen la capacidad de segregar el anticuerpo monoclonal (MAb) específico de anti-huL-17.
- 10
- 15
- 20 *Producción y purificación del anticuerpo:* Los clones seleccionados se transfieren en medio sin suero (5 ml) sobre matraces TC de 25 cm<sup>2</sup> (TC: cultivo de tejidos). Los hibridomas se expanden progresivamente en medio sin suero hasta matraces TC de 75 cm<sup>2</sup> y a matraces de agitación. Todos los diferentes MAb anti-hu-IL-17 que incluyen NVP-AIN457-NX (340-110-28, es decir, el número de ratón-número de hibridoma-número de clon) se purifican mediante una cromatografía de afinidad de proteína A. Los sobrenadantes del cultivo se ajustan a pH 7,3 y se cargan en una columna con un tamaño apropiado de proteína A-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia). Después del lavado de la línea de base con tampón fosfato 100 mM, pH 7,3, los anticuerpos unidos se eluyen con citrato 50 mM, pH 2,7, NaCl 140 mM. La fracción eluida inmediatamente se neutraliza (pH 7,0) y se esteriliza mediante filtración. La concentración de proteínas se determina mediante absorción a 280 nm empleando un factor de 1,35 unidades de absorción (AU)/mg.
- 25
- 30 *Actividad inhibidora del MAb anti-huL-17 sobre la producción de IL-6 inducida por huL-17 en fibroblastos dérmicos humanos:* Se cultivan fibroblastos dérmicos humanos en FBM suplementado con FCS al 2%, insulina (5 µg/ml), huFGF-básico (0,1 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml). Los fibroblastos se desprenden del plástico empleando una disolución de tripsina/EDTA. Los fibroblastos se distribuyen en placas de microtitulación de 96 pocillos a una

densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo en FBM suplementado con FCS al 1%. Se deja que los fibroblastos se adhieran a las placas durante la noche. A la mañana siguiente, el medio se retira y se añade FBM fresco suplementado con FCS al 1%, hUL-17 (a diferentes concentraciones que varían de 30 a 500 ng/ml) y los sobrenadantes del hibridoma (1/5 dilución final) o anticuerpos purificados, hasta un volumen final de 200  $\mu$ l. Los sobrenadantes del cultivo se recogen después de una incubación de 24 h y se mide la producción de hUL-6 mediante ELISA.

*ELISA para la detección de anticuerpos anti-hUL-17:* Placas de microtitulación de ELISA se revisten con hUL-17 recombinante (100  $\mu$ l/pocillo a 3  $\mu$ g/ml; lote BM-E3141/98 o En.E-3382/82) en PBS,  $\text{NaN}_3$  al 0,02%, y se incuba durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas de microtitulación se bloquean con 300  $\mu$ l de PBS/BSA al 2%/ $\text{NaN}_3$  al 0,02% durante 2 h a 37 °C. Las placas después se lavan 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05%/ $\text{NaN}_3$  al 0,02%. Se añaden diluciones en suero de ratón 27340 (intervalo de dilución final en el día 35: 1/100 a 1/3200; intervalo de dilución final en el día 99: 1/200 a 1/12800; 100  $\mu$ l/pocillo) o los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas (dilución final 1:3; 100  $\mu$ l/pocillo). Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, las placas se lavan 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05% 20/ $\text{NaN}_3$  al 0,02%. Se añade un anticuerpo específico de fragmento Fc, anti-hu-IgG de ratón conjugado con biotina a una dilución final de 1/20000 (100  $\mu$ l/pocillo). Se deja que las muestras reaccionen durante 4 h a temperatura ambiente. Después de lavar (4 veces), se añade estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina a una dilución final de 1/8000 (100  $\mu$ l/pocillo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se vuelven a lavar 4 veces y se añade el sustrato (p-nitrofenilfosfato en tampón dietilamino, pH 9,8; 150  $\mu$ l/pocillo). Las placas se leen después de 30 o 45 min dependiendo del desarrollo de la reacción en un lector de microtitulación (Bio-Rad) empleando filtros de 405 y 490 nm.

*ELISA para la detección del isotipo del anticuerpo:* Para revelar el isotipo del MAb se añaden los sobrenadantes del cultivo (100  $\mu$ l; dilución final 1/5) a los pocillos de placas de microtitulación revestidas con hUL-17 (véase anteriormente), y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar (4 veces), se añaden 100  $\mu$ l/pocillo de MAb de ratón conjugados con biotina anti-IgG1 humana (dilución final 1/1000), IgG2 (dilución final 1/1000), IgG3 (dilución final 1/1000), IgG4 (dilución final 1/2000) o anti-cadena ligera  $\kappa$  humana (dilución final 1/1000) durante 4 h a temperatura ambiente. Como control se emplea un MAb específico anti-cadena ligera  $\lambda$ 1 y  $\lambda$ 2 de rata conjugado con biotina (dilución final 1/1000). A esto le sigue, tal como describió anteriormente, un lavado y la adición de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (100  $\mu$ l; dilución final 1/8000). Después de lavar (4 veces), se añade el sustrato (p-nitrofenilfosfato en tampón dietilamino; 100  $\mu$ l). Las placas se leen después de 30 o 45 min dependiendo del desarrollo de la reacción en un lector de microtitulación (Bio-Rad) empleando filtros de 405 y 490 nm.

*ELISA para la detección de la producción de hUL-6:* Se revisten placas de microtitulación de ELISA con MAb anti-hUL-6 de ratón (MAB206 de R&D system; 100  $\mu$ l/pocillo a 4  $\mu$ g/ml) en PBS,  $\text{NaN}_3$  al 0,02%, y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas de microtitulación se bloquean con 300  $\mu$ l de PBS/BSA al 2%/ $\text{NaN}_3$  al 0,02% durante 2 h a 37 °C. Las placas después se lavan 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05%/ $\text{NaN}_3$  al 0,02%. Se añaden los sobrenadantes del cultivo de fibroblastos dérmicos humanos (dilución final 1:3; 100  $\mu$ l/pocillo). Para establecer una curva de titulación se titula la hUL-6 (100  $\mu$ l/pocillo) de 400 pg/ml a 3,1 pg/ml en etapas de dilución 1:2. Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, las placas se lavan 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05% 20/ $\text{NaN}_3$  al 0,02%. Se añade un anticuerpo anti-hUL-6 de cabra conjugado con biotina (BAP206; R&D Systems) (25 ng/ml; 100  $\mu$ l/pocillo). Se deja que las muestra reaccionen durante 4 h a temperatura ambiente. Después de lavar (4 veces), se añade estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina a una dilución final de 1/8000 (100  $\mu$ l/pocillo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se vuelven a lavar 4 veces y se añade el sustrato (p-nitrofenilfosfato en tampón dietilamino, pH 9,8; 150  $\mu$ l/pocillo). Las placas se leen después de 30 min en un lector de microtitulación (Bio-Rad) empleando filtros de 405 y 490 nm.

*Cálculos:* Los valores se indican como valores de D.O. originales o como porcentaje de inhibición calculado sobre la media de valores por duplicado. Otros datos se indican como medias  $\pm$  MEE. Se empleó una curva patrón de hUL-6 para medir la concentración de hUL-6 en los sobrenadantes del cultivo empleando un ajuste de curva cúbico.

## Resultados

*Titulaciones en suero de ratón 27340:*

Tabla 2. Titulaciones en suero de anti-huLL-17 (ratón 27340)

		Dilución en suero									
		Valores de D.O. (medias ± MEE)									
Día	Lote Hull-17 *	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800		
35	<i>E. coli</i>	1,795 ± 0,022	1,524 ± 0,006	1,167 ± 0,015	0,854 ± 0,013	0,615 ± 0,005	0,378 ± 0,032				
	HEK/EBNA	2,180 ± 0,041	1,875 ± 0,005	1,577 ± 0,047	1,313 ± 0,016	1,031 ± 0,011	0,728 ± 0,003				
99	<i>E. coli</i>		2,130 ± 0,078	1,913 ± 0,075	1,635 ± 0,041	1,494 ± 0,066	1,125 ± 0,001	0,810 ± 0,070	0,559 ± 0,021		
	HEK/EBNA		2,029 ± 0,005	1,925 ± 0,030	1,716 ± 0,012	1,524 ± 0,004	1,259 ± 0,018	0,970 ± 0,036	0,706 ± 0,002		

\* Las placas de microtitulación se revistieron con huLL-17 (3 µg/ml) procedente de *E. coli* (BM-E3141/98) o de células HEK/EBNA (En.E-3382/82).

5 El suero de ratón 27340 se analiza con ELISA para la presencia de anticuerpos anti-huLL-17 en los días 35 y 99 sobre dos preparaciones diferentes de huLL-17 (tabla 2). Los resultados demuestran que las titulaciones en suero de ratón 27340 aumentan en cuatro veces entre el día 35 y el día 99, y que ambas preparaciones de huLL-17 son reconocidas.

10 *Unión con ELISA de los sobrenadantes de hibridoma:* Se ensayaron 684 sobrenadantes con ELISA para la presencia de anticuerpos anti-huLL-17, empleando dos preparaciones de huLL-17 recombinante, la primera procedente de *E. coli* (BM-E3141/98) y la segunda de células HEK/EBNA (En.E-3382/82). Cincuenta y dos sobrenadantes puntuaron positivo para la presencia de anticuerpos anti-huLL-17 (tabla 3). En algunos casos se observa una unión preferente a una u otra preparación de huLL-17. Los 28 hibridomas que después se clonaron están subrayados.

Tabla 3. Reactividad con ELISA de los sobrenadantes de cultivo

Hibridoma (n.º)	Valores de D.O. de Hull-17 del lote* de <i>E. coli</i>	Valores de D.O. de HEK/EBNA	Hibridoma (n.º)	Valores de D.O. de Hull-17 del lote de <i>E. coli</i>	Valores de D.O. de HEK/EBNA
<u>1</u>	<u>1,935/1,830</u>	ND	386	1,780/1,812	2,002/1,905
<u>3</u>	<u>1,928/1,928</u>	<u>2,026/1,956</u>	435	2,194/2,139	2,221/2,169
<u>5</u>	<u>1,386/1,471</u>	<u>2,099/2,042</u>	<u>439</u>	<u>1,180/1,236</u>	<u>1,442/1,470</u>
<u>59</u>	<u>1,917/2,078</u>	<u>2,342/2,384</u>	<u>444</u>	<u>1,034/1,066</u>	<u>1,166/1,138</u>
<u>66</u>	<u>1,629/1,619</u>	ND	<u>450</u>	<u>2,060/2,209</u>	<u>2,079/2,237</u>
<u>104</u>	<u>2,650/2,716</u>	<u>2,439/2,366</u>	<u>477</u>	<u>1,392/1,348</u>	<u>1,515/1,524</u>

ES 2 536 228 T3

<u>106</u>	<u>1,329/1,371</u>	<u>1,362/1,465</u>	496	2,131/2,078	2,569/2,798
<u>110</u>	<u>2,355/2,363</u>	<u>2,425/2,497</u>	<u>504</u>	<u>1,755/1,559</u>	<u>ND</u>
112	0,789/0,857	1,154/1,208	<u>543</u>	<u>2,332/2,455</u>	<u>2,370/2,381</u>
<u>116</u>	<u>1,656/1,652</u>	<u>ND</u>	<u>544</u>	<u>1,145/1,196</u>	<u>1,187/1,201</u>
128	1,244/1,669	0,714/0,695	548	0,728/0,750	0,891/0,909
<u>142</u>	<u>1,192/1,322</u>	<u>0,847/0,810</u>	552	0,824/0,811	0,969/0,943
<u>173</u>	<u>1,899/2,108</u>	<u>1,966/2,023</u>	<u>557</u>	<u>2,241/2,326</u>	<u>2,347/2,483</u>
182	0,948/0,903	0,874/0,866	564	0,628/0,675	0,808/0,820
190	2,249/2,084	2,150/2,139	566	1,092/1,068	1,239/1,152
196	1,406/1,305	1,797/1,752	577	1,018/0,928	1,226/1,206
216	1,120/1,146	1,114/1,128	<u>597</u>	<u>0,781/0,821</u>	<u>1,117/1,121</u>
<u>234</u>	<u>1,890/1,990</u>	<u>ND</u>	<u>612</u>	<u>1,935/1,777</u>	<u>2,033/1,989</u>
<u>277</u>	<u>1,674/1,640</u>	<u>ND</u>	<u>622</u>	<u>2,121/2,230</u>	<u>2,592/2,277</u>
285	0,678/0,789	0,735/0,784	<u>627</u>	<u>1,000/1,077</u>	<u>1,203/1,209</u>
298	2,475/2,677	2,340/2,358	649	1,335/1,389	1,311/1,337
<u>305</u>	<u>1,721/1,789</u>	<u>0,602/0,634</u>	<u>658</u>	<u>1,218/1,297</u>	<u>1,415/1,437</u>
319	1,111/1,073	1,223/1,202	674	1,112/1,087	1,134/1,127
328	1,738/1,762	1,869/1,835	686	1,447/1,549	1,730/1,646
<u>343</u>	<u>2,478/2,702</u>	<u>2,302/2,448</u>	705	1,899/1,803	1,870/1,872
373	1,200/1,194	1,212/1,233	720	2,249/2,420	2,383/2,385
* Las placas se revistieron con hUL-17 recombinante (3 µg/ml) procedente de <i>E. coli</i> (BM-E3141/98) o de células HEK/EBNA (En.E-3382/82). Los sobrenadantes se ensayaron a la dilución final de 1/3.					

*Unión con ELISA de los sobrenadantes de cultivo de los clones de hibridoma:* La reactividad con ELISA de los sobrenadantes de los clones de los 11 hibridomas que conservan la mejor producción de MAb anti-hUL-17 se muestra en la tabla 4. Los clones, destacados en negrita, se seleccionaron por producir aproximadamente 1 litro de sobrenadante en botellas de agitación para la purificación y el análisis de los anticuerpos. Con la excepción de los clones derivados del hibridoma n.º 5, que produce un anticuerpo hulgG3k, todos los demás clones produjeron el MAb hulgG1k, según se evalúa con anticuerpos monoclonales específicos de isotipo.

Tabla 4. Reactividad con ELISA de los sobrenadantes de cultivo para hu-IL-17.

Clon (n.º)	Valores de D.O. de los sobrenadantes*	Clon (n.º)	Valores de D.O. de los sobrenadantes*	Clon (n.º)	Valores de D.O. de los sobrenadantes*
3-2	2,198/1,940	<u>106-1</u>	<u>1,244/1,306</u>	543-4	<u>1,003/0,913</u>
<u>3-20</u>	<u>1,909/1,939</u>	106,2	1,203/1,138	543-16	0,795/0,717
3-21	1,873/1,812	106-3	1,176/1,166	557-6	0,879/0,940
5-18	1,240/1,168	110-7	1,535/1,393	557-36	0,980/0,925
5-22	1,340/1,396	<u>110-28</u>	<u>1,376/1,370</u>	557-37	1,104/1,109
5.29	1,316/1,354	305-21	1,484/1,518	<u>622-2</u>	<u>0,923/0,894</u>
5.31	1,227/1,302	305-38	<u>1,669/1,858</u>	622-5	1,070/1,032
<u>5-40</u>	<u>1,364/1,543</u>	<u>343-1</u>	<u>1,351/1,375</u>	622-6	0,980/0,953
104-2	1,385/1,299	439-80	2,506/2,543	658-2	0,744/0,744
104-4	1,085/1,044	450-13	1,568/1,610	658-6	0,769/0,772
104-9	1,488/1,304	<u>450-23</u>	<u>1,658/1,667</u>	<u>658-16</u>	<u>0,741/0,758</u>
<u>104-11</u>	<u>1,670/1,380</u>	543-1	1,074/0,991		

Las placas de microtitulación se revistieron con huIL-17 recombinante (3 µg/ml) procedente de células HEK/EBNA (En.E-3382/82).

5 *Actividad neutralizante de los sobrenadantes de cultivo:* Los sobrenadantes de cultivo se ensayaron para la inhibición de la producción de huIL-6 por fibroblastos dérmicos humanos estimulados con huIL-17 recombinante. Tal como se muestra en la tabla 5, la mayoría de los sobrenadantes de cultivo muestran actividad inhibitoria.

Tabla 5. Inhibición de la producción de IL-6 inducida por huIL-17 en fibroblastos dérmicos humanos por los sobrenadantes de cultivo

Clon	Inhibición de la producción de IL-6 (%)			
	Cantidad de huIL-17 empleada como estímulo (ng/ml)			
(n.º)	62,5	125	250	500
3-20	86,3	75,0	33,1	23,2
5-40	23,3	41,4	20,3	19,0
104-11	47,7	48,5	22,2	16,3
106.1	61,6	19,8	5,7	9,8

110-28	99,8	92,5	88,6	61,3
305-38	47,2	47,1	36,6	23,7
343-1	96,8	102,4	90,5	66,4
450-23	51,7	48,5	47,5	26,6
543.4	-6,0	-12,0	-6,5	-7,1
622-2	34,0	23,2	20,3	18,4
658-16	34,4	27,7	12,7	18,8

*Actividad neutralizante de AIN45:* La selección del clon 110-28 para la producción del candidato en desarrollo AIN457 (la realización preferida de la invención) se basa en la actividad neutralizante y la medición de afinidad sobre BIAcore 2000 de los anticuerpos purificados (véase a continuación el ejemplo 2).

- 5 **Ejemplo 2: AIN457 se une con una afinidad muy alta a IL-17 humana recombinante (hull-17); la  $K_D$  es de  $122 \pm 22$  pM (BIAcore) y neutraliza la producción de IL-6 humana inducida por hull-17 en fibroblastos dérmicos humanos; la IC50 es de  $2,1 \pm 0,1$  nM a una concentración de hull-17 1,87 nM**

**a) Métodos**

10 Reactivos: Los reactivos de laboratorio generales se adquirieron en Merck o Sigma y son del máximo grado de pureza disponible; las fuentes de los reactivos de especialidad se detallan a continuación.

15 Proteínas: Los anticuerpos monoclonales se generaron inmunizando ratones transgénicos MEDAREX con IL-17 humana recombinante, y después siguiendo el procedimiento convencional para producir líneas celulares, a partir de las cuales puede purificarse el material segregado mediante una cromatografía de proteína A-Sepharose (fundamentalmente como se describe en el ejemplo 1). AIN457 se conserva como una disolución esterilizada mediante filtración en Na-citrato 50 mM, pH 7,0, NaCl 140 mM a 4 °C. El AIN457 humano recombinante (lote KB03303A) se obtiene en una disolución madre estéril de tampón Na-citrato 20 mM/fosfato 40 mM, pH 7, NaCl 150 mM, o ácido acético 20 mM, pH 5,5, ajustado con Tris-base 1 M. Las concentraciones habitualmente están en el intervalo de 2 mg/ml y se diluyen hasta una concentración final de 5 µg/ml en tampón BIA (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05% en v/v) para los experimentos BIAcore.

20 La IL-17 humana recombinante se produjo en el laboratorio de los inventores; lote En/E 3882/83; 0,29 mg/ml.

**Mediciones de BIAcore**

25 La determinación de los parámetros de unión cinética y de los niveles de reactividad cruzada se realiza mediante mediciones de resonancia de plasmón de superficie empleando el biodetector óptico BIAcore 2000 (BIAcore AB, Uppsala, Suecia, véase Lit. HS 1,2 para más detalles). Esta tecnología permite la determinación sin marcadores de las constantes de velocidad microscópica para la unión ( $k_{on}$ ) y la disociación ( $k_{off}$ ) de un ligando a un receptor. Por tanto, resulta especialmente adecuada para caracterizar interacciones de anticuerpo-antígeno. Esta tecnología complementa, y en muchos aspectos es superior, a las mediciones de ELISA (Van Regenmortel, Dev. Biol. (Basilea), 2003, 112:141-51). Los estudios de unión de la IL-17 recombinante con el anticuerpo de IL-17 AIN457 se realizan de dos modos. En el protocolo convencional, AIN457 es capturado por un anticuerpo anti-Fcγ humano (Jackson Immunochemicals; n.º de catálogo 109-005-098) que había sido previamente inmovilizado sobre un chip detector CM-5 BIAcore (calidad de investigación). La unión covalente del anticuerpo de captura de Fcγ se realiza con el 'kit de acoplamiento de amina' proporcionado por BIAcore (BIAcore, n.º de catálogo BR-1000-50). Generalmente, 3000 RU del anticuerpo de captura se unen a la superficie de dextrano activado con una disolución de anticuerpo anti-Fcγ 30 µg/ml en tampón Ac 10 mM, pH 4,5, a un caudal de 5 µl/min que conduce a aproximadamente 250 RU de inmovilización de AIN457. Como guía, 1000 RU se corresponden con una transferencia de masa de 1 ng/mm<sup>2</sup>. Como alternativa, el anticuerpo de IL-17 (sección 3.2; tabla 4) AIN457 se acopla directamente sobre la superficie del chip sin anticuerpo de captura. Los resultados se comparan con el protocolo descrito en la tabla 9 (véase a continuación).

35

**b) Resultados**

**Cinética de unión del complejo de IL-17/AIN457**

5 La constante de disociación en equilibrio  $K_D$  permite cierta valoración acerca de la estabilidad de los complejos, después de que se formen *vivo*. Por tanto, los inventores han determinado las constantes cinéticas para la unión de IL-17 humana al anticuerpo AIN457 inmovilizado, y han obtenido la  $K_D$  para los procesos a partir de estos datos. La tabla 3 muestra el resumen de los datos obtenidos cuando las curvas de 2 experimentos se ajustan al modelo de Langmuir empleando el programa informático BIAevaluation 3.0. Aunque, por supuesto, el anticuerpo es bivalente, la unión puede ser tratada como un acontecimiento 1:1, con los sitios de unión al anticuerpo individuales sobre la superficie ocupados por moléculas de IL-17 monoméricas.

10 Este experimento demuestra la asociación extremadamente rápida, así como la cinética de disociación muy lenta, del complejo de anticuerpo-quimioquina. El mejor ajuste de datos se obtiene cuando los sensogramas se tratan de modo individual (y no globalmente, tal como se sugiere en la BIAevaluación.) Así, después de combinar la serie de titulación se obtiene la media de los valores a partir de 12 sensogramas de  $k_{on} = (4,1 \pm 0,1) \times 10^5$  1/M s;  $k_{off} = (3,8 \pm 0,5) \times 10^{-4}$  1/s; y para  $K_D = 122 \pm 22$  pM.

15 **Tabla 3. Constantes cinéticas para la unión 1:1 de IL-17 humana recombinante a NVP-AIN457**

Conc. [nM]	$k_{on}$ [1/Ms]	$k_{off}$ [1/s]	$K_D$ [M]	Exp. IL-314
2	3,31E+05	3,36E-05	1,02E-10	Ensayo 1
4	1,28E+05	3,78E-05	2,95E-10	
8	3,79E+05	1,86E-05	4,90E-11	
12	3,60E+05	3,00E-05	8,33E-11	
16	3,52E+05	5,70E-05	1,62E-10	
20	3,52E+05	4,15E-05	1,18E-10	
2	1,23E+06	1,97E-05	1,60E-11	Ensayo 2
4	4,11E+05	1,20E-05	2,92E-11	
8	3,78E+05	4,54E-05	1,20E-10	
12	3,46E+05	5,13E-05	1,48E-10	
16	3,17E+05	5,95E-05	1,88E-10	
20	3,34E+05	5,01E-05	1,50E-10	
<b>Media</b>	4,10E+05	3,80E-05	1,22E-10	n = 12
<b>MEE</b>	7,73E+04	4,51E-06	2,21E-11	

Media de  $K_D$  calculada a partir de las entradas individuales (verticales), en lugar de aplicar la ecuación  $K_D = k_{off}/k_{on}$ .

20 Para el AIN457 producido en células recombinantes (KB03303A), las mediciones de afinidad se realizan para las citoquinas IL-17 de ser humano, tí, mono rhesus y cynomolgous, respectivamente. Los detalles experimentales de las mediciones Biacore son los mismos que los descritos anteriormente para el anticuerpo MAB 110-28. Se realizaron dos ensayos independientes que analizan 6 concentraciones de IL-17 en cada ensayo. Las concentraciones de IL-17 humana son 2, 4, 8, 12, 16, 20 nM, y de 10, 20, 30, 40, 50, 60 nM para todas las demás especies. El análisis completo de los datos produce n = 12 mediciones individuales para cada especie de IL-17. Se indica la  $K_D$ , así como la MEE.

**Tabla 4. Resumen: Constantes cinéticas para la unión 1:1 de IL-17 recombinante humana, de tífi, mono rhesus y cynomolgous a NVP-AIN457 (KB03303A)**

Especie	KD [M], media del ensayo 1+2	MEE
Humana	0,227 nM	+/- 0,03 nM
Tití	1,2 nM	+/- 0,1 nM
Mono rhesus	9 nM	+/- 1 nM
Mono cynomolgous	6 nM	+/- 0,7 nM

5 En las siguientes tablas 5 a 8 se indica el conjunto completo de los datos del análisis BIAcore para el anticuerpo KB03303A con  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y  $K_D$  y las respectivas especies de IL-17.

**Tabla 5. Constantes cinéticas para la unión 1:1 de IL-17 humana recombinante a NVP-AIN457 (KB03303A)**

Conc. [nM]	$k_{on}$ [1/Ms]	$k_{off}$ [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/IL-365
2	3,37E+05	6,43E-05	1,91E-10	Ensayo 1
4	2,59E+05	7,76E-05	2,99E-10	
8	2,12E+05	5,21E-05	2,46E-10	
12	2,18E+05	7,38E-05	3,38E-10	
16	2,02E+05	7,15E-05	3,54E-10	
20	1,92E+05	8,04E-05	4,20E-10	
2	5,50E+05	7,01E-05	1,27E-10	Ensayo 2
4	3,22E+05	3,30E-05	1,02E-10	
8	2,85E+05	4,73E-05	1,66E-10	
12	2,86E+05	4,84E-05	1,69E-10	
16	2,61E+05	3,09E-05	1,18E-10	
20	2,58E+05	4,90E-05	1,90E-10	
<b>Media</b>	<b>2,82E+05</b>	<b>5,82E-05</b>	<b>2,27E-10</b>	n = 12
<b>MEE</b>	2,77E+04	4,91E-06	3,00E-11	

**Tabla 6. Constantes cinéticas para la unión 1:1 de IL-17 de tífi recombinante a NVP-AIN457 (KB03303A)**

Conc. [nM]	$k_{on}$ [1/Ms]	$k_{off}$ [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/IL-365
10 nM	8,89E+04	7,96E-05	8,95E-10	Ensayo 1
20 nM	1,11E+05	8,69E-05	7,82E-10	
30 nM	9,82E+04	1,15E-04	1,17E-09	
40 nM	9,92E+04	1,16E-04	1,17E-09	
50 nM	9,81E+04	1,19E-04	1,21E-09	
10 nM	8,83E+04	9,98E-05	1,13E-09	Ensayo 2
20 nM	1,10E+05	1,28E-04	1,17E-09	
30 nM	9,70E+04	1,52E-04	1,57E-09	
40 nM	9,66E+04	1,31E-04	1,36E-09	
50 nM	9,52E+04	1,59E-04	1,67E-09	
<b>Media</b>	<b>9,83E+04</b>	<b>1,19E-04</b>	<b>1,21E-09</b>	n = 10
<b>MEE</b>	2,36E+03	8,09E-06	±0,1	

**Tabla 7. Constantes cinéticas para la unión 1:1 de IL-17 de mono rhesus recombinante a NVP-AIN457 (KB03303A)**

Conc. [nM]	$k_{on}$ [1/Ms]	$k_{off}$ [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/IL-365
10	1,70E+05	3,89E-04	2,28E-09	Ensayo 1
20	6,73E+04	4,94E-04	7,34E-09	
30	5,86E+04	3,54E-04	6,04E-09	
40	3,27E+04	4,05E-04	1,24E-08	
50	4,05E+04	4,55E-04	1,12E-08	
60	3,50E+04	4,60E-04	1,31E-08	
10	5,47E+04	3,85E-04	7,04E-09	Ensayo 2
20	4,62E+04	2,74E-04	5,93E-09	
30	4,30E+04	3,51E-04	8,16E-09	
40	3,76E+04	3,66E-04	9,74E-09	

50	3,60E+04	4,32E-04	1,20E-08	
60	3,44E+04	4,24E-04	1,23E-08	
<b>Media</b>	<b>5,47E+04</b>	<b>3,99E-04</b>	<b>8,96E-09</b>	n = 12
<b>MEE</b>	1,09E+04	1,72E-05	9,70E-10	

**Tabla 8. Constantes cinéticas para la unión 1:1 de IL-17 de mono cynomologus recombinante a NVP-AIN457 (KB03303A)**

Conc. [nM]	k <sub>on</sub> [1/Ms]	k <sub>off</sub> [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/IL-365
5 nM	3,27E+05	3,60E-04	1,10E-09	Ensayo 1
10 nM	1,79E+05	4,02E-04	2,24E-09	
15 nM	1,03E+05	5,67E-04	5,50E-09	
20 nM	1,10E+05	5,23E-04	4,75E-09	
25 nM	9,23E+04	5,78E-04	6,26E-09	
30 nM	9,05E+04	7,14E-04	7,89E-09	
5 nM	7,18E+04	5,08E-04	7,08E-09	Ensayo 2
10 nM	9,70E+04	6,69E-04	6,90E-09	
15 nM	1,03E+05	7,66E-04	7,41E-09	
20 nM	1,02E+05	7,32E-04	7,17E-09	
25 nM	1,02E+05	7,47E-04	7,34E-09	
30 nM	1,00E+05	8,34E-04	8,32E-09	
<b>Media</b>	<b>1,23E+05</b>	<b>6,17E-04</b>	<b>6,00E-09</b>	n = 10
<b>MEE</b>	1,99E+04	4,34E-05	6,52E-10	

- 5 Después se evaluó la actividad inhibitora de AIN457 purificado (lote En/E-10333/53; 0,54 mg/ml) sobre huIL-17. Los valores de IC<sub>50</sub> se muestran en la tabla 6. En estos experimentos, se incluye huIL-17R/Fc y un MAb anti-huIL-17 de ratón como controles positivos, y Simulect como control negativo.

**Tabla 9. Neutralización de hu-IL-17 por el MAb anti-huIL-17 humana AIN457 en comparación con IL-17R/Fc, y un MAb anti-huIL-17 MAb de ratón (sistema R&D).**

	AIN457	IL-17 R/Fc	MAB 317
	IC <sub>50</sub> ± MEE	IC <sub>50</sub> ± MEE	IC <sub>50</sub> ± MEE
	(n = 3*)	(n = 3)	(n = 3)
huIL-17 recombinante a 1,87 nM (30 ng/ml)	2,071 ± 0,116 nM	1,713 ± 0,305 nM	12,226 ± 2,050 nM
* Las medias y las MEE se calculan a partir de tres experimentos diferentes e independientes.			

5 En conclusión, AIN457 abroga la secreción dependiente de IL-17 de huIL-6 por fibroblastos dérmicos humanos. La potencia es comparable con la de huIL-17R/Fc y superior a la del MAb anti-huIL-17 de ratón disponible en el mercado. Resulta interesante advertir que se observa una inhibición más completa con AIN457 que con IL-17R/Fc.

### Ejemplo 3: Pureza y secuencias de aminoácidos parciales de la secuenciación de aminoácidos de la cadena pesada y ligera

10 *Secuencias de aminoácidos amino-terminales de las regiones of V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>*: Los primeros 48 restos aminoácidos de la cadena pesada y ligera para dos anticuerpos anti-IL-17A, el clon 110-7 (véase la tabla 4) y 110-28 (véase la tabla 4), se determinan mediante la degradación de Edman. La secuencia de aminoácidos es idéntica para ambos clones. Se realiza una búsqueda en GeneBank mediante un análisis Blast y la secuencia de ADN más homóloga encontrada se emplea para diseñar los cebadores de clonación.

15 *Clonación molecular de las regiones VL y VH*: Se prepara el ARN total a partir de 2 x 10<sup>7</sup> células de hibridoma (clon 110-7, clon 110-28) con el kit RNeasy Midi Kit según el protocolo del vendedor (Quiagen Hilden Alemania). El ARN total se eluye en 200 µl de agua sin ARNasa y se conserva a -80 °C. La síntesis de la primera hebra del ADNc se realiza con la transcriptasa inversa M-MLV (Promega, Madison, WI), cebador oligo-dT, mezcla de nucleótidos de PCR (dNTP) e inhibidor de ARNsin (Roche, Mannheim). Se mezclan 5 µg de ARN total con 1 µl de cebador oligo-dT (0,5 µg/µl), y se añade agua sin ARNasa hasta un volumen final de 36 µl. La mezcla se incuba a 70 °C durante 10 minutos y después se conserva en hielo. Mientras está conservada en hielo se añaden los siguientes reactivos: 10 µl  
20 5x tampón RT, 2 µl de dNTP (10 mM cada uno), 2 µl de ARNsin y 1 µl de transcriptasa inversa M-MLV. La reacción se realiza a 42 °C durante 1 hora.

25 La reacción de PCR se monta empleando 4 µl de molde de ADNc, 2 µl de cada cebador a 10 µM cada uno (véase a continuación y las tablas 10 y 11 para un resumen), 20 µl de 2x Qiamix (que contiene tampón, dNTP, TAQ polimerasa) y 1 µl de ADN polimerasa Pwo en un volumen total de 40 µl. Las condiciones de la PCR se ajustan para 35 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 20 segundos, y 72 °C durante 30 segundos. El producto de la PCR se subclona en el vector de clonación pCR4-TOPO-Zero (Stragagene, La Jolla, Ca.). Se escogen varios clones de cada reacción y se determina la secuencia de nucleótidos mediante Solvias AG (Basel), empleando los  
30 cebadores MV432 (SEQ ID NO:21), MV433 (SEQ ID NO:22), MV434 (SEQ ID NO:23), MV435 (SEQ ID NO:14), y los cebadores patrón en el ADN del vector.

35 El ADNc que codifica la cadena pesada se amplifica empleando las parejas de cebadores MV416 (SEQ ID NO:15)#265 (SEQ ID NO:16) y MV418 (SEQ ID NO:17)#265 (SEQ ID NO:16). Los cebadores cubren las secuencias de nucleótidos que se corresponden con las siguientes posiciones de aminoácidos de la cadena pesada: MV416 posición -19/-13 (péptido señal); MV418 posición +1/+7; #265 posición +253/+259. La posición +1 es el primer aminoácido de la proteína madura.

40 El ADNc que codifica la cadena ligera se amplifica empleando las parejas de cebadores MV417 (SEQ ID NO:18)#223 (SEQ ID NO:19) y MV419 (SEQ ID NO:20)#223 (SEQ ID NO:19). Los cebadores cubren las secuencias de nucleótidos que se corresponden con las siguientes posiciones de aminoácidos de la cadena ligera: MV417 posición -20/-14 (péptido señal); MV419 posición +1/+7; #223 posición +210/+215. Esta estrategia permite  
realizar dos amplificaciones de PCR independientes para cada cadena de inmunoglobulina, lo cual produce dos secuencias de ADN determinadas de modo independiente.

### Resultados y análisis

45 Los productos de la PCR clonados que codifican la cadena pesada y ligera de dos hibridomas (110-7 y 110-28, véase la anterior tabla 4) se caracterizan mediante secuenciación de ADN. Se emplean cinco y seis secuencias independientes para ensamblar las secuencias de cadena ligera y pesada. Los ADNc de cadena ligera son todos idénticos y cubren la secuencia codificadora completa (posiciones de aminoácidos -20 a +215). Los ADNc de las

5 cadenas pesadas tienen 2 desapareamientos diferentes, uno en cada ADNc. Estos se excluyen de la secuencia final, que se extiende desde el codón de inicio hasta el final de región de bisagra después del dominio constante 1 (posiciones de aminoácidos -19 a +238). Las secuencias de ambos hibridomas son idénticas. El ADNc obtenido del hibridoma 110-28 se selecciona y es emplea para los posteriores trabajos de expresión. SEQ ID NO:7 (ADNc de la cadena pesada de AIN457), SEQ ID NO:8 (secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de AIN457), SEQ ID NO:9 (ADNc de la cadena ligera de AIN457), y SEQ ID NO:10 (secuencia de aminoácidos de AIN457) muestran la secuencia de ADN que codifica la cadena ligera y pesada de AIN457, junto con la secuencia de proteína y la posición de los cebadores empleados para la amplificación con PCR y la secuenciación de ADN. Las secuencias de ADN se han registrado en PlasNova, n.º de registro NPL003689 para la cadena pesada, y n.º de registro NPL003690 para la cadena ligera.

10 La secuencia de aminoácidos descubierta mediante clonación de ADNc es idéntica a la que previamente se había obtenido mediante degradación de Edman de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, lo cual indica que se ha clonado el ADNc correcto.

**Tabla 10. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera**

La secuencia de aminoácidos que codifica el dominio variable aparece en **negrita** y **subrayada**. Se indican los cebadores oligonucleotídicos empleados para la clonación (subrayados).

**MV417** ACCATGGAAACCCAGCGGAGCTTCTCTTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCACC  
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60  
 TGGTACCTTTGGGGTCGCCCGAAGAGAAGGAGGACGATGAGACCGAGGGTCTATGGTGG  
  
 T M E T P A E L L F L L L L W L P D T T -

**MV419** GGAGAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCGTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC  
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120  
 CCTCTTAAACACAACCTGCGTCAGAGGTCGGTGGGACAGAAACAGAGGTCCCCTTTCTCGG  
  
 G E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A -

ACCCTCTCTGTCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG  
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180  
 TGGGAGAGGACGTCGCCGTCAGTCTCACAATCGTCGATGAATCGGACCATGGTCGTC  
  
T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q -

AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATC  
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240  
 TTTGGACCGGTCGAGGGTCCGAGGAGTAGATACCACGTAGGTCGTCGCCGTTGACCGTAG  
  
K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I -

CCAGACAGGTTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTG  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300  
 GGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCCAGACCCTGTCTGAAGTGAGAGTGGTAGTCTGCTGAC  
  
P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L -

GAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGCACCTTC  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360  
 CTCGGACTTCTAAAACGTACATAATGACAGTCGTCATACCATCGAGTGGAGCGTGGGAAAG  
  
E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P C T F -

361	GGCCAAGGACACGACTGGAGATTAACGAACCTGGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420 CCGGTTCCTGTGCTGACCTCTAATTGCTTGACACCGACGTGGTAGACAGAAGTAGAAG  <b><u>G Q G T R L E I K R</u></b> T V A A P S V F I F -
421	CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCCTGTGTGTGCCTGCTGAATAAC -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480 GGCGGTAGACTACTCGTCAACTTTAGACCTTGACGGAGACAACACACGGGACGACTTATTG  P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N -
481	TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540 AAGATAGGGTCTCTCCGGTTTCATGTCACCTTCCACCTATGCGGGAGGTTAGCCCATG  F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N -
541	TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600 AGGGTCCCTCTCAGTGTCTCGTCCGTGCTGCTGCGGATGTCGGAGTCGTCTGCTGG  S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T -
601	CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660 GACTGCGACTCGTTTCGTCTGATGCTCTTTGTGTTTCAGATGCGGACGCTTCAGTGGGTA  L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H -
661	CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 711 <b>#223</b> <u>GTCCCGGACTCGAGCGGGCAGTGTTC</u> <u>CGAAGTTGTC</u> <u>CCCTCTCACAATC</u>  Q G L S S P V T K S F N R G E C * -

**Tabla 11. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena pesada**

La secuencia de aminoácidos que codifica el dominio variable aparece en negrita y subrayada. Se indican los cebadores oligonucleotídicos empleados para la clonación y la secuenciación.

<b>MV416</b>	<u>ACCATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTCCTTGTGCTATTTTAGAAGGTGTC</u> <u>CACTGT</u> 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60 TGGTACCTTAACCCCGACTCGACCCAAAAGGAACAACGATAAAATCTTCCACAGGTGACA  T M E L G L S W V F L V A I L E G V H C -
<b>MV418</b>	<u>GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC</u> 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120 CTCCACGTCAACCACCTCAGACCCCTCCGAACCAGGTCGGACCCCCAGGGACTCTGAG  <b><u>E V Q L V E S G G G L V Q P G S L R L</u></b> -
121	TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAACTATTGGATGAACCTGGGTCGCCAGGCT -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180 AGGACACGTCGGACACCTAAGTGAAATCATTGATAACCTACTTGACCCAGGCGGTCCGA  <b><u>S C A A S G F T F S N Y W M N W V R Q A</u></b> -

<p>CCAGGGAAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCGCATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTAT  181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240  GGTCCTTTCCCGACCTCACCCACCGCGGTATTGGTTCTACCTTCACTCTTTATGATA</p> <p><u>P G K G L E W V A A I N Q D G S E K Y Y</u> -</p>
<p>GTGGGCTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT  241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300  CACCCGAGACACTTCCCGGCTAAGTGGTAGAGTCTCTGTTCGGTTCTTGAGTGACATA</p> <p><u>V G S V K G R F T I S R D N A K N S L Y</u> -</p>
<p><b>MV432</b> CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGGGACTAT  301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360  GACGTTTACTTGTGGACTCTCAGTCTGTGCCGACACATAATGACACACTCCCTGATA</p> <p><u>L Q M N S L R V E D T A V Y Y C V R D Y</u> -</p> <p>TACGATATTTGACCGATTATTACATCCACTATTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGC</p>
<p>361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420  ATGCTATAAAACTGGCTAATAATGTAGGTGATAACCATGAAGCTAGAGACCCCGGCACCG</p> <p><u>Y D I L T D Y Y I H Y W Y F D L W G R G</u> -</p>
<p><b>MV433</b> ACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC  421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480</p> <p><b>MV434</b> TGGGACCAGTGACAGAGGAGTCGGAGG<u>TGGTCCCGGTAGCCAGAA</u>GGGGGACCGTGGG</p> <p><u>T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P</u> -</p>
<p>TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC  481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540  AGGAGGTTCTCGTGGAGACCCCGTGTCCGGGACCCGACGGACCGATTCTGATGAAG</p> <p>S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F -</p>
<p>CCCGAACCGGTGACGTTGCTGGAACCTCAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTC  541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600  GGGCTTGGCCACTGCCACAGCACCTTGAGTCCGCGGGACTGGTCGCCGACGTTGGAAG</p> <p>P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F -</p>
<p>CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC  601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660  GGCCGACAGGATGTCAGGAGTCTGAGATGAGGGAGTCGTCGCACCCTGGCACGGGAGG</p> <p>P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S -</p>
<p>AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAG  661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720</p> <p><b>MV435</b> TCGTCGAACCCGTGGGCTGGATGTAGACGTGCACCTTAGTGTTCGGGTCGTTGGGTT</p> <p>S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K -</p>
<p>GTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA  721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780</p> <p><b>#265</b> CACCTGTCTCTCAACTCGGGTTTAGAACACTGTTTTGAGTGTGTACGGGTGGCACGGGT</p> <p>V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P -</p>

TAA  
781 --- 783  
ATT  
\*

#### Ejemplo 4: Estructura tridimensional del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal anti-IL-17A humana AIN457

5 Para determinar la conformación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y las estructuras del sitio de unión al antígeno de AIN457 se genera el fragmento Fab, se cristaliza y se determina su estructura de rayos X mediante cristalografía de proteínas.

10 **Método:** El fragmento Fab de NVP-AIN457 se produce mediante la ruptura con papaína del anticuerpo completo y se purifica mediante una cromatografía de proteína A, seguida de una cromatografía de exclusión molecular. El material purificado después se concentra mediante ultrafiltración hasta 20 mg/ml en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 25 mM, TCEP 5 mM. Los cristales se hacen crecer mediante la técnica de difusión de vapor en gotas colgantes a 19 °C, en sulfato de amonio 2,0 M, PEG 400 al 5%, Na MES 0,1 M, pH 6,5. Aparecen en el grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> con unas dimensiones de celda unidad a = 90,3 Å, b = 106,7 Å, c = 131,4 Å y 2 moléculas Fab por unidad asimétrica. Antes de la recolección de los datos de rayos X, un único cristal de Fab de AIN457 se entrecruza con glutaraldehído empleando el método de Lusty (J. Appl. Cryst. (1999), 32, 106-112) y después se transfiere a una disolución que contiene Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,0 M, PEG 400 al 2%, y Na MES 0,1 M, pH 6,5. El cristal después se monta en una criohorquilla y se congela de forma instantánea para la recogida de los datos a 95 K. Se registran 180 imágenes de difracción que se corresponden con una oscilación de 1,0° cada una. Los datos de difracción se procesan con el paquete informático HKL. La estructura se determina hasta una resolución de 2,5 Å mediante sustitución molecular. Después la estructura se refina mediante dinámica de ángulo de torsión y minimización de la energía empleando el programa CNX.

20 **Resultados:** Están presentes dos moléculas de Fab de AIN457 en la unidad asimétrica del cristal, estando el bucle de H-CDR3 de ambas moléculas Fab implicado en los contactos de proteína-proteína con el bucle de H-CDR3 de Fab de simetría relacionada. Las dos moléculas de Fab muestran diferentes ángulos de codo pero, por lo demás, tienen conformaciones del bucle de CDR fundamentalmente idénticas (véase la tabla 12 para la secuencia de aminoácidos de los bucles de CDR). El bucle de H-CDR1 adopta la estructura canónica H1:1 esperada, mientras que la conformación del bucle H-CDR2 se corresponde con la estructura canónica H2:3A. El bucle de H-CDR3 del anticuerpo AIN457 es excepcionalmente largo, y comprende 18 restos entre las posiciones de Kabat 94 (Arg H98) y 101 (Asp H115). Muestra la típica estructura de torso abultado estabilizada por un puente salino entre la cadena lateral de la Arg en la posición 94 (Arg H98) y el grupo carboxilato de Asp en la posición H101 (Asp H115), y por una interacción con enlace de H entre la cadena lateral de Trp H117 y el grupo carbonilo de la cadena principal de Phe H114. La cabeza del bucle de H-CDR3 tiene la estructura de una horquilla-beta retorcida y larga con un segundo abultamiento-beta en su base y una vuelta-beta de tipo I' en su ápice. Una característica sorprendente del bucle de H-CDR3 de AIN457 es su contenido muy alto en restos aromáticos: 6 tirosinas, 2 triptófanos, 1 fenilalanina. Puesto que todos los demás bucles de CDR aportan 1 tirosina más cada uno, el sitio de combinación con el antígeno de AIN457 posee 11 tirosinas en total. Las conformaciones de los bucles de L-CDR1 y L-CDR2 se corresponden con las estructuras canónicas L1:6 y L2:1, respectivamente. En contraste con H-CDR3, el bucle de L-CDR3 es corto (6 restos) y muestra la estructura canónica que se observa habitualmente L3:1, con una cis-prolina en su punta (Pro L96), una glutamina en la posición de Kabat 90 (Gln L91) y una trenonina en la posición de Kabat 97 (Thr L98). Sin embargo, una característica muy poco habitual del bucle de L-CDR3 de AIN457 es la presencia de un resto cisteína después de la cis-prolina (Cys L97). La cadena lateral de Cys L97 se encuentra en el fondo de una depresión poco profunda localizada en la interfase de V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> y está tapizada por los restos Trp H112, Trp H47 y Tyr L92.

Tabla 12

Cadena ligera		
◦ L-CDR1	Definición de Kabat	R-A-S-Q-S-V-S-S-Y-L-A
	Definición de Chothia/rayos X	R-A-S-Q-S-V-S-S-Y-L-A
◦ L-CDR2	Definición de Kabat	G-A-S-S-R-A-T
	Definición de Chothia/rayos X	G-A-S-S-R-A-T

◦ L-CDR3	Definición de Kabat	Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T
	Definición de Chothia/rayos X	<b>Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T</b>
<b>Cadena pesada</b>		
◦ <b>H-CDR1</b>	Definición de Kabat	N-Y-W-M-N
	Definición de Chothia/rayos X	<b>G-F-T-F-S-N-Y-W-M-N</b>
◦ H-CDR2	Definición de Kabat	A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y-V-G-S-V-K-G
	Definición de Chothia/rayos X	<b>A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y</b>
◦ H-CDR3	Definición de Kabat	D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L
	Definición de Chothia/rayos X	<b>C-V-R-D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-1-H-Y-W-Y-F-D-L-W-G</b>

5 Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de los anticuerpos monoclonales AIN457, basadas en la definición de Kabat y determinadas mediante el análisis de rayos X, empleando la estrategia de Chothia y colaboradores. Los aminoácidos indicados en negrita son parte de los bucles de CDR, mientras que los que se muestran con el formato normal son parte del marco del anticuerpo.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> Novartis AG

5 <120> Compuesto orgánico

<130> 4-33392P1

<160> 23

10 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 5

15 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> región CDR1 de AIN457

20 <220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(5)

<223> CDR1 = región hipervariable 1 de cadena pesada de AIN457

25 <400> 1

**Asn Tyr Trp Met Asn**

**1 5**

30 <220> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

35 <220>

<223> CDR2 de AIN457

<220>

<221> DOMINIO

40 <222> (1)..(17)

<223> CDR2 = región hipervariable 2 de cadena pesada de AIN457

<400> 2

**Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val Lys**

**1 5 10 15**

45 **Gly**

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

50 <213> artificial

<220>

<223> CDR3 de AIN457

55 <220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(18)

<223> CDR3 = región hipervariable 3 de cadena pesada de AIN457

<400> 3

**Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr Trp Tyr Phe**  
**1 5 10 15**

**Asp Leu**

5

<210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10

<220>  
 <223> CDR1' de AIN457

15

<220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (1)..(12)  
 <223> CDR1' = región hipervariable 1 de cadena ligera de AIN457

20

<400> 4  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
**1 5 10**

25

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

30

<220>  
 <223> CDR2' de AIN457

35

<220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (1)..(7)  
 <223> CDR2' = región hipervariable 2 de cadena ligera de AIN457

<400> 5

**Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr**

40

**1 5**  
 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial

45

<220>  
 <223> CDR3' de AIN457

50

<220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (1)..(9)  
 <223> CDR3' = región hipervariable 3 de cadena ligera de AIN457

55

<400> 6  
**Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Cys Thr**  
**1 5**

ES 2 536 228 T3

<210> 7  
<211> 381  
<212> ADN  
5 <213> *Homo sapiens*

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(381)  
10 <223> ADN del dominio de cadena pesada de AIN457

<400> 7

**gag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg**

**48**

**Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly**

**1**

**5**

**10**

**15**

**tcc ctg aga .ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agt aac tat**

**96**

**Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr**

**20**

**25**

**30**

**tgg atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg**

**144**

**Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val**

**35**

**40**

**45**

15

ES 2 536 228 T3

gcc gcc ata aac caa gat gga agt gag aaa tac tat gtg ggc tct gtg  
192

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

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat  
240

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

ctg caa atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gct gtg tat tac tgt  
288

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

gtg agg gac tat tac gat att ttg acc gat tat tac atc cac tat tgg  
336

Val Arg Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr Trp  
100 105 110

tac ttc gat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc act gtc tcc tca  
381

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 8

<211> 127

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly



ES 2 536 228 T3

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg

48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc

96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20

25

30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc

144

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35

40

45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt

192

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag

240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65

70

75

80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg

288

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85

90

95

tgc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cga

327

Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

- 5 <210> 10
- <211> 109
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

- 10 <400> 10



<220>  
 <223> CDR2-x de AIN457

<220>  
 5 <221> DOMINIO  
 <222> (1)..(11)  
 <223> CDR2-x = dominio hipervariable de cadena pesada x de AIN457

<400> 12

10 **Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr**  
**1 5 10**

<210> 13  
 <211> 23  
 15 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> CDR3-x de AIN457

20 <220>  
 <221> DOMINIO  
 <222> (1)..(23)  
 <223> CDR3-x = dominio hipervariable x de cadena pesada de AIN457

25 <400> 13

**Cys Val Arg Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr**  
**1 5 10 15**

**Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly**  
**20**

30 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial

35 <220>  
 <223> Cebador para la clonación de la cadena pesada de AIN457

<220>  
 <221> cebador\_unión  
 40 <222> (1)..(20)  
 <223> MV432

<400> 14

**gactattacg atattttgac**

45 **20**

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> artificial

<220>  
 <223> Cebador para la clonación de la cadena pesada de AIN457

<220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(20)  
 <223> MV433  
 5 <400> 15  
**gcctccacca agggcccatc**  
**20**  
 10 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador para la clonación de la cadena pesada de AIN457  
 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 20 <222> (1)..(20)  
 <223> MV434  
 <400> 16  
**tggttccccgg gtagccagaa**  
**20**  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador para la clonación de la cadena pesada de AIN457  
 35 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(20)  
 <223> MV435  
 40 <400> 17  
**ccacctgttc tctcaactcg**  
**20**  
 <210> 18  
 45 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 50 <223> PCR de la cadena pesada de AIN457  
 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(24)  
 55 <223> MV416  
 <400> 18  
**accatggaat tggggctgag ctgg**  
**24**

<210> 19  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> PCR de la cadena pesada de AIN457  
  
 10 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(26)  
 <223> #265  
  
 15 <400> 19  
  
**gagtgtgtac gggtagcacg ggtatt**  
**26**  
  
 <210> 20  
 20 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 25 <223> PCR de la cadena pesada de AIN457  
  
 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(21)  
 30 <223> MV418  
  
 <400> 20  
  
**gaggtgcagt tggtaggagtc t**  
**21**  
  
 35 <210> 21  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 40 <220>  
 <223> PCR de la cadena ligera de AIN457  
  
 <220>  
 45 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(24)  
 <223> MV417  
  
 <400> 21  
  
 50 **accatggaaa cccagcgga gctt**  
**24**  
  
 <210> 22  
 <211> 22  
 55 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 60 <223> PCR de la cadena ligera de AIN457  
  
 <220>

<221> cebador\_unión  
<222> (1)..(22)  
<223> #223

5 <400> 22

**gaagttgtcc cctctcacia tc**

**22**

10 <210> 23  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> artificial

15 <220>  
<223> PCR de la cadena ligera de AIN457

20 <220>  
<221> cebador\_unión  
<222> (1)..(21)  
<223> MV419

<400> 23

**gaaatttgtt tgacgcagtc t**

**21**

25

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, que comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V<sub>H</sub>) y cadena ligera (V<sub>L</sub>), para su uso en el tratamiento de la espondilitis anquilosante, en el que dicho anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende:
- 5 a) un V<sub>H</sub> que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3, en el que dichas regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Kabat; o
- 10 un V<sub>H</sub> que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, teniendo dicha CDR1-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11, teniendo dicha CDR2-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:12, y teniendo dicha CDR3-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13, en el que dichas regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Chothia; y
- 15 b) un V<sub>L</sub> que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6.
- 2.- El anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, para su uso según la reivindicación 1, que es un anticuerpo humano.
- 3.- Un anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos un sitio de unión al antígeno que comprende:
- 20 a) un V<sub>H</sub> que tiene una secuencia de aminoácidos según se muestra en SEQ ID NO:8;
- b) un V<sub>L</sub> que tiene una secuencia de aminoácidos según se muestra en SEQ ID NO:10; o
- c) un V<sub>H</sub> que tiene una secuencia de aminoácidos según se muestra en SEQ ID NO:8, y un V<sub>L</sub> que tiene una secuencia de aminoácidos según se muestra en SEQ ID NO:10.
- 25 4.- Un anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo IgG1/K humano que comprende:

(a) una cadena ligera que consiste en los restos aminoácidos que comienzan en el resto +1 de la tabla 10

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S  
 C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A  
 P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S  
 G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y  
 C Q Q Y G S S P C T F G Q G T R L E I K R T  
 V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S  
 V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A  
 L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L  
 S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T  
 H Q G L S S P V T K S F N R G E C ;

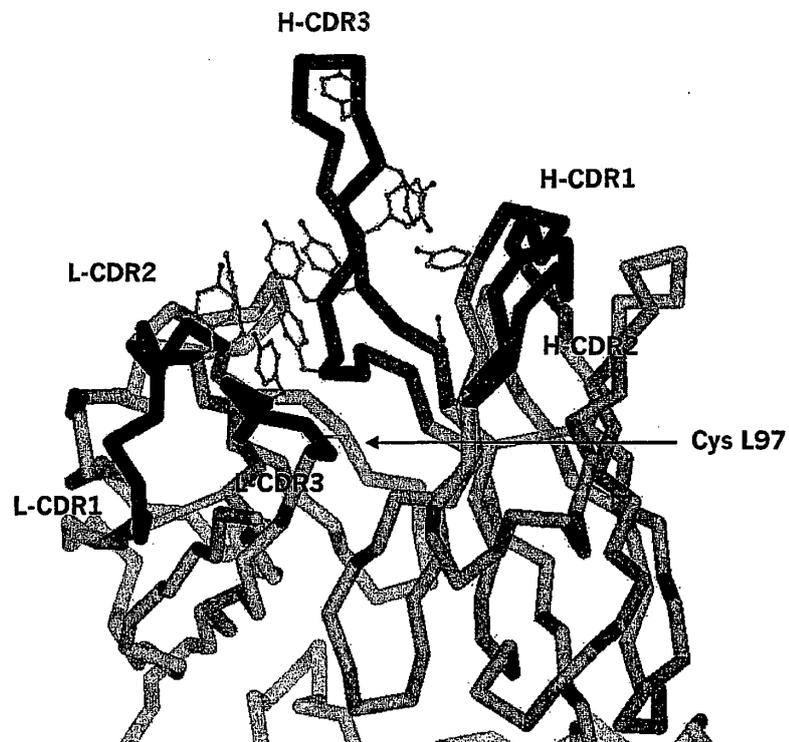
y

30

(b) una cadena pesada que comprende en los restos aminoácidos que comienzan en el resto +1 de la tabla 11

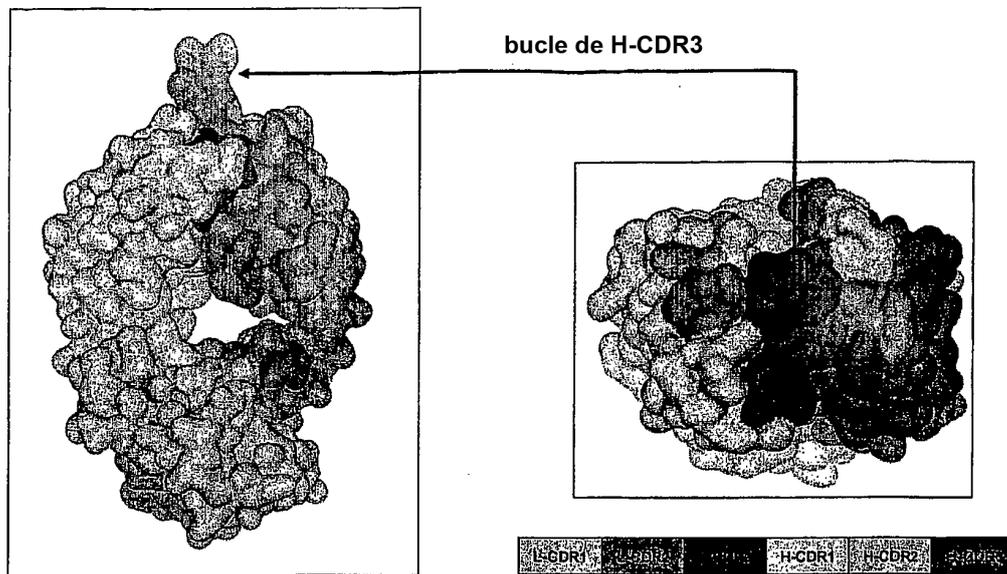
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C  
 A A S G F T F S N Y W M N W V R Q A P G K G  
 L E W V A A I N Q D G S E K Y Y V G S V K G  
 R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R V  
 E D T A V Y Y C V R D Y Y D I L T D Y Y I H  
 Y W Y F D L W G R G T L V T V S S A S T K G  
 P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C  
 L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G  
 V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V  
 P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K  
 V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P.

- 5.- El anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos , para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, se coadministra, al mismo tiempo o en secuencia, con al menos una segunda sustancia de fármaco seleccionada del grupo que consiste en agentes inmunosupresores, agente inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos o agentes antiinfecciosos.
- 5
- 6.- El anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, para su uso según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo de unión a IL-17, o uno de sus fragmentos, se coadministra, al mismo tiempo o en secuencia, con sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina; un modulador de la recirculación de linfocitos, por ejemplo, FTY720 y análogos de FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo, rapamicina, 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo, ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato mofetilo; 15-desoxiespergualina.
- 10
- 15



**Figura 1. Estructura de rayos X del Fab de AIN457 Fab**

Primer plano de los dominios variables del Fab de AIN457 (señal  $\square$ ), destacándose las regiones determinantes de la complementariedad. Se muestran todas las cadenas laterales de tirosina aportadas por los bucles de CDR para ilustrar el hecho de que el sitio de combinación con el antígeno de AIN457 es excepcionalmente rico en restos tirosina. También se muestra la cadena lateral de Cys L97, en la interfase de  $V_H-V_L$  (flecha).



**Figura 2. Estructura de rayos X del Fab de AIN457, vista general**

Representación de la superficie de Van der Waals del Fab de AIN457. La cadena ligera y pesada tienen un color gris claro y oscuro, respectivamente. Los bucles de CDR se destacan con diferentes colores. Nótese la presencia del gran bucle de H-CDR3 que sobresale del sitio de combinación con el antígeno del anticuerpo.