

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 917**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2013** **PCT/US2013/036677**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013** **WO13158577**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2013** **E 13726321 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** **EP 2838920**

54 Título: **Anticuerpos biespecíficos anti-BAFF-anti-IL-17**

30 Prioridad:

20.04.2012 US 201261636302 P
25.02.2013 US 201361768747 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2017

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

ALLAN, BARRETT;
BENSCHOP, ROBERT JAN y
LU, JIRONG

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 621 917 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 biespecíficos anti-BAFF-anti-IL-17

La presente invención pertenece al campo de la medicina, en particular al nuevo campo de los anticuerpos biespecíficos dirigidos contra el factor activador de células B de la familia del TNF (BAFF) y la interleuquina-17A (IL-17). Se espera que los anticuerpos biespecíficos de la presente invención sean útiles para tratar la nefritis lúpica (NL), el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoide (AR), la psoriasis (Ps), la espondilitis anquilosante (EA), la artritis psoriásica (AP), el síndrome de Sjögren primario (SSp), o el mieloma múltiple (MM).

Se ha asociado un aumento en los niveles de IL-17 con varias afecciones, enfermedades o trastornos, que incluyen la inflamación de las vías respiratorias, la artritis reumatoide, la osteoartritis, la erosión ósea, los abscesos y las adhesiones intraperitoneales, el trastorno inflamatorio del intestino, el rechazo de aloinjertos, la psoriasis, ciertos tipos de cánceres, la angiogénesis, la aterosclerosis y la esclerosis múltiple. La IL-17 y el receptor de IL-17 se encuentran sobreexpresados en el tejido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide. El bloqueo de la bioactividad de IL-17 reduce la inflamación y la erosión ósea en diversos modelos animales de artritis. Además, la IL-17 posee efectos independientes de IL-1 β sobre la degradación de la matriz de colágeno y la inflamación y los daños en articulaciones, mientras que la IL-17 presenta sinergia con el TNF- α para amplificar la inflamación. Así, debido a su distribución localizada en el sitio de la inflamación, la IL-17 parece que pueda constituir una diana posible para el tratamiento de la artritis reumatoide y otras enfermedades inflamatorias o autoinmunitarias, con un perfil de seguridad potencialmente mayor que los fármacos que se dirigen a la circulación sistémica de citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF- α .

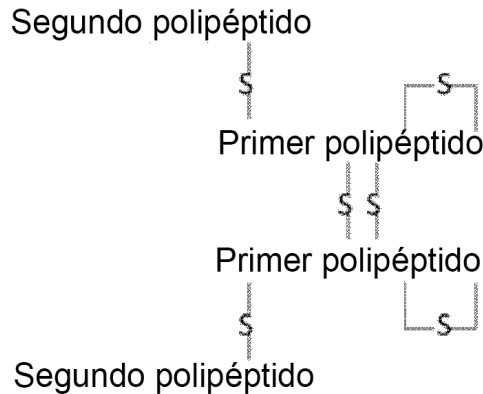
La implicación del factor activador de células B (BAFF) en la patogénesis de las enfermedades autoinmunitarias se ilustra por la sobreexpresión de BAFF en modelos de ratón, que provoca que la enfermedad autoinmunitaria imite a la artritis reumatoide, al lupus eritematoso sistémico y al síndrome de Sjögren primario, así como que se produzca un aumento en dos veces de la aparición del linfoma de células B. En seres humanos, numerosos informes han demostrado unos niveles elevados de BAFF en suero en pacientes con LES, AR, SSp, y esclerosis sistémica. Se ha demostrado que BAFF estimula la expansión de células Th17 y que la IL-17 es una citoquina efectora crucial para los efectos proinflamatorios mediados por BAFF durante el desarrollo de la artritis inducida por colágeno. También se ha demostrado que la IL-17 actúa en sinergia con BAFF para influir en la biología de las células B y la patofisiología del LES. También existen pruebas de que tanto BAFF como IL-17 desempeñan un papel en la patología asociada con la LN; de hecho, se ha indicado los pacientes con LN presentan niveles elevados de IL-17 y BAFF.

El LES es una enfermedad autoinmunitaria multisistémica y muy heterogénea que se caracteriza por el desarrollo de autoanticuerpos y por la formación de complejos inmunológicos. Se calcula que 30-60% de los pacientes con LES presentan implicaciones renales en algún momento del desarrollo de su enfermedad. La NL es una enfermedad autoinmunitaria multifactorial compleja. Si se deja sin tratar, la tasa de supervivencia a los 5 años de los pacientes con NL es del 0-20%. La introducción de la terapia inmunosupresora ha mejorado muchísimo esta situación, y la tasa de supervivencia a los 10 años actual es del 88%. Sin embargo, esta mejora tiene un coste para el paciente, puesto que muchos de estos tratamientos presentan graves acontecimientos adversos, en especial debido a que deben recibirse de forma crónica. Además, la respuesta es lenta y, a menudo, incompleta, y solo 25-50% de los pacientes consiguen la remisión.

La coadministración de un anticuerpo de BAFF y un anticuerpo de IL-17 requiere inyecciones de los dos productos distintos o una única inyección de una coformulación de los dos anticuerpos diferentes. Dos inyecciones permitirían flexibilizar la cantidad de dosis y el programa de administración, pero suponen una molestia para los pacientes, porque dificultan el cumplimiento y causan dolor. Una coformulación también podría proporcionar cierta flexibilidad en las cantidades de las dosis, pero a menudo resulta problemático o imposible determinar las condiciones de formulación que permitan la estabilidad química y física de ambos anticuerpos, debido a las diferentes características moleculares de los dos anticuerpos distintos.

El documento US 7.317.089 B2 desvela anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a polipéptidos de TNFSF13b humanos con alta afinidad. Los anticuerpos neutralizan la actividad TNFSF13b *in vitro* e *in vivo* y se indica que son útiles para inhibir la actividad TNFSF13b en un sujeto humano que padece un trastorno en el que la actividad hTNFSF13b es perjudicial. El documento WO19509917 desvela un procedimiento para producir anticuerpos tetravalentes biespecíficos (Mab-scFV) empleando la tecnología del ADN recombinante por medio de la producción de un fragmento variable de anticuerpo monocatenario condensado con un anticuerpo completo que tiene una especificidad diferente. Esta fusión génica se expresa por medio de una transfección, que resulta en un anticuerpo tetravalente que tiene una especificidad dual. El documento WO2003016468 desvela anticuerpos anti-BAFF que se unen a las formas solubles y unidas a membrana de la BAFF humana y las neutralizan. El documento WO2007070750 describe anticuerpos anti-IL-17 que se unen a la IL-17 humana y la neutralizan. Sin

- embargo, cuando siguieron las indicaciones del documento WO199509917 para crear un anticuerpo biespecífico de partida que comprende los anticuerpos anti-BAFF del documento WO2003016468 y los anticuerpos anti-IL-17 del documento WO2007070750, los inventores del presente documento descubrieron problemas importantes asociados con la estabilidad química y física. Fueron necesarios muchos cambios en los aminoácidos del anticuerpo biespecífico de partida para solucionar suficientemente estos problemas. En la técnica no se sugiere esta necesidad ni los cambios realizados. Además, estos cambios no son habituales ni se derivan del conocimiento corriente general. De modo similar, los propios anticuerpos individuales no presentan estos problemas, lo cual sugiere que el entorno local alrededor de estas áreas es diferente en el contexto de los anticuerpos biespecíficos. Así, es necesaria una intervención farmacológica con un anticuerpo biespecífico que neutralice a BAFF y a IL-17.
- La presente invención proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos.
- En el presente documento se describe una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el primer polipéptido.
- En el presente documento se describe además una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el segundo polipéptido.
- En el presente documento se describe además una molécula de ADN que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el primer polipéptido y el segundo polipéptido.
- En el presente documento se describe además una célula de mamífero transformada con una o más moléculas de ADN, siendo capaz dicha célula de expresar un anticuerpo biespecífico que comprende el primer polipéptido y el segundo polipéptido.
- En el presente documento se describe además un procedimiento para producir un anticuerpo biespecífico que comprende el primer polipéptido y el segundo polipéptido, que comprende cultivar la célula de mamífero bajo determinadas condiciones que permiten que el anticuerpo biespecífico se exprese.
- En el presente documento se describe además un anticuerpo biespecífico producido por dicho procedimiento.
- En el presente documento se describe además un procedimiento para tratar el lupus eritematoso sistémico, la nefritis lúpica, la artritis reumatoide, la psoriasis, la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica, el síndrome de Sjögren primario, o el mieloma múltiple, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un anticuerpo biespecífico.
- La presente invención también proporciona un anticuerpo biespecífico para su uso en terapia.
- La presente invención también proporciona un anticuerpo biespecífico para su uso en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, la nefritis lúpica, la artritis reumatoide, la psoriasis, la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica, el síndrome de Sjögren primario, o el mieloma múltiple.
- La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo biespecífico, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- La IL-17 humana significa una proteína homodimérica que comprende dos proteínas de IL-17A humanas. Un heterodímero de IL-17A/F humano es una proteína de IL-17A humana y una proteína de IL-17F humana.
- Un anticuerpo biespecífico significa una molécula de inmunoglobulina que comprende cuatro sitios de unión al antígeno, que se une a dos antígenos diferentes con especificidad para cada antígeno en el formato de MAb-scFV. El anticuerpo biespecífico es capaz de unirse a cada antígeno por sí solo o a cada antígeno simultáneamente.
- El anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos. Cada uno de los primeros polipéptidos forma un enlace disulfuro intercatenario con cada uno de los segundos polipéptidos, y el primer polipéptido forma dos enlaces disulfuro intercatenarios con el otro primer polipéptido, y cada uno de los primeros polipéptidos forma varios enlaces disulfuro intracatenarios. La relación de los polipéptidos y los enlaces disulfuro se muestra en el siguiente esquema:



La secuencia de aminoácidos del primer polipéptido es:

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE 50
 INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARGYY 100
 DILTGYYYYF DYWGQGT LVT VSSASTKGPS VFPLAPCSRS TSESTAALGC 150
 LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTV PSSSLG 200
 TKTYTCNV DH KPSNTKVDKR VESKYGP PCP PCPAPEFLGG PSVFLFPKP 250
 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSI EKTIS KAKGQPREPQ 350
 VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 400
 LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGG 450
 GSGGGGGTGG GGSQVQLVQS GAEVKKPGSS VKVSC KASGY KFTDYHIHWV 500
 RQAPGQCLEW MGVINPTYGT TDYNQRFKGR VTITADESTS TAYMELSSLR 550
 SEDTAVYYCA RYDYFTGTGV YWGQGT LVTV SSGGGGSGGG GSGGGGSGGG 600
 GSDIVMTQTP LSLSVTPGQP ASISCRSSRS LVHSRGETYL HWYLQKPGQS 650
 PQLLIYKVS N RFIGVPDRFS GSGSGTDFTL KISRVEAEDV GVYYCSQSTH 700
 LPFTFGCGTK LEIK 714 (SEQ ID NO:1).

5 La secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido es:

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS RYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50
 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD STLTISSELP EDFAVYYCQQ RSNWPRTFGQ 100
 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLN NFY PREAKVQWKV 150
 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSN TLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200
 LSSPVTKSFN RGEC 214 (SEQ ID NO:2).

El enlace disulfuro intercatenario de cada uno de los primeros polipéptidos y cada uno de los segundos polipéptidos se forma entre el resto cisteína 137 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 214 de SEQ ID NO: 2. El primer polipéptido forma dos enlaces disulfuro intercatenarios con el otro primer polipéptido. El primer enlace

disulfuro intercatenario se forma entre el resto cisteína 229 del primer polipéptido de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 229 del otro primer polipéptido de SEQ ID NO: 1. El segundo enlace disulfuro intercatenario se forma entre el resto cisteína 232 del primer polipéptido de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 232 del otro primer polipéptido de SEQ ID NO: 1.

- 5 Dentro del scFV, se forma un enlace disulfuro intracatenario modificado entre el resto cisteína 507 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 707 de SEQ ID NO: 1. Además, se forma un enlace disulfuro intracatenario entre el resto cisteína 625 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 695 de SEQ ID NO: 1. Dentro del MAb, los enlaces disulfuro intracatenarios que normalmente aparecen en un anticuerpo IgG4 se forman entre el resto cisteína 22 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 95 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 150 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 206 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 264 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 324 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 370 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 428 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 485 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 559 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 23 de SEQ ID NO: 2 y el resto cisteína 88 de SEQ ID NO: 2, y entre el resto cisteína 134 de SEQ ID NO: 2 y el resto cisteína 194 de SEQ ID NO: 2.

- 15 El primer polipéptido comprende una primera región variable de cadena pesada (HCVR1), una región constante de cadena pesada (CH), una segunda región variable de cadena pesada (HCVR2) y una segunda región variable de cadena ligera (LCVR2). Los segundos polipéptidos comprenden una primera región variable de cadena ligera (LCVR1) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), intercaladas entre las regiones de marco (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el amino-terminal hasta el carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Las 3 CDR de HCVR1 se denominan CDRH1-1, CDRH1-2, y CDRH1-3, las 3 CDR de HCVR2 se denominan CDRH2-1, CDRH2-2, y CDRH2-3, las 3 CDR de LCVR1 se denominan CDRL1-1, CDRL1-2 y CDRL1-3, y las 3 CDR de LCVR2 se denominan CDRL2-1, CDRL2-2 y CDRL2-3.

- 25 La CH está unida a HCVR2 a través de un conector de aminoácidos (L1). HCVR2 está unida a LCVR2 a través de un conector de aminoácidos (L2).

La relación entre las diversas regiones y conectores es la siguiente:

Polipéptido 1 - SEQ ID NO: 1			Polipéptido 1 - SEQ ID NO: 2		
	Región	Posiciones		Región	Posiciones
HCVR1 BAFF	FRH1-1	1-26	LCVR1 BAFF	FRL1-1	1-23
	CDRH1-1	27-35		CDRL1-1	24-34
	FRH1-2	36-49		FRL1-2	35-49
	CDRH1-2	50-65		CDRL1-2	50-56
	FRH1-3	66-97		FRL1-3	57-88
	CDRH1-3	98-112		CDRL1-3	89-97
	FRH1-4	113-123		FRL1-4	98-107
Constante	CH	124-447	Constante	CL	108-214
Conector	L1	448-463			
HCVR2 IL-17	FRH2-1	464-487-			
	CDRH2-1	488-498			
	FRH2-2	499-512			
	CDRH2-2	513-528			
	FRH2-3	529-561			

(continuación)

Polipéptido 1 - SEQ ID NO: 1			Polipéptido 1 - SEQ ID NO: 2		
	CDRH2-3	562-571			
	FRH2-4	572-582			
Conector	L2	583-602			
LCVR2 IL-17	FRL2-1	603-625			
	CDRL2-1	626-641			
	FRL2-2	642-656			
	CDRL2-2	657-663			
	FRL2-3	664-695			
	CDRL2-3	696-704			
	FRL2-4	705-714			

Modificación del anticuerpo biespecífico

5 Cuando se construyó un anticuerpo biespecífico en el formato MAb-scFv con la porción de unión del anti-IL-17 en la configuración scFv, se encontraron problemas significativos asociados con la estabilidad química y física. Se realizaron modificaciones químicas en las porciones CDRL2-1 y CDRH2-2 del anticuerpo biespecífico que mejoraron la estabilidad física y redujeron la agregación dependiente de la concentración. Estudios profundos sobre la solubilidad y la estabilidad de la proteína identificaron restos químicamente inestable en CDRL2-1 y CDRH2-2. Estos restos lábiles fueron reemplazados por aminoácidos de carga neutra empleando bancos de transporte dirigido contruidos por medio de la eliminación de codones. Además, se calculó la superficie electrostática del anticuerpo biespecífico y se identificaron las zonas cargadas. Las alteraciones de estas zonas cargadas en el scFv condujeron a una disminución en la autoasociación de las proteínas. Sin embargo, se identificó una mutación en la porción CDRH2-1 del anticuerpo biespecífico que reequilibra la distribución electrostática de la superficie y mejora la solubilidad y la estabilidad física a concentraciones elevadas. En los anticuerpos individuales de origen no aparecieron ninguna de estas cuestiones. Estos problemas solo aparecieron en el contexto de la construcción de un anticuerpo biespecífico en el formato de MAb-scFv, lo cual sugiere que el entorno local alrededor de las áreas mutadas del anticuerpo individual es diferente en el contexto de un anticuerpo biespecífico.

20 Se realizaron otras modificaciones químicas para estabilizar la interfase HCVR2/LCVR2 en la porción de IL-17 del anticuerpo biespecífico y para reducir la agregación del anticuerpo biespecífico. Estudios realizados para determinar la agregación demostraron que la autoasociación de las proteínas observada no estaba provocada por la inestabilidad conformacional de los dominios HCVR2 o LCVR2 individuales, sino por la apertura o respiración de la interfase HCVR2/LCVR2, que conduce a interacciones intermoleculares de las proteínas. Así, se introdujeron diversos enlaces disulfuro intracatenarios en la interfase HCVR2/LCVR2 de la porción de IL-17 del anticuerpo biespecífico. Uno de estos enlaces disulfuro intracatenarios aparece en cada uno de los primeros polipéptidos entre el resto cisteína 507 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 707 de SEQ ID NO: 1. Este enlace disulfuro conecta covalentemente la interfase HCVR2/LCVR2 en la porción de IL-17 del anticuerpo biespecífico, que estabiliza la interfase HCVR2/LCVR2 y reduce las interacciones intermoleculares de las proteínas que pueden conducir a una inestabilidad física y a limitaciones de formulación desfavorables. De los nueve enlaces disulfuro distintos 30 ensayados, de los cuales 8 expresaban la proteína funcional, la magnitud de pérdida de afinidad variaba de aproximadamente 2 a aproximadamente 35 veces. El enlace disulfuro intracatenario en cada uno de los primeros polipéptidos entre el resto cisteína 507 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 707 de SEQ ID NO: 1 es el que mejor estabiliza la interfase HCVR2/LCVR2, manteniendo, al mismo tiempo, una óptima afinidad de unión por IL-17.

35 Además, los estudios han indicado que la longitud del conector para L1 afecta a la cinética de unión. El análisis cinético (mediante resonancia de plasmón de superficie) demostró que un conector de 10 aminoácidos es responsable de una reducción en dos veces de la velocidad de K_{on} , comparado con conectores de 15 aminoácidos y de 20 aminoácidos. Por tanto, se introdujo una longitud de conector de 15 en el anticuerpo biespecífico de la presente invención.

Unión del anticuerpo biespecífico

Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención se unen al BAFF humano y a la IL-17 humana y neutralizan al menos una bioactividad del BAFF humano y al menos una bioactividad de la IL-17 humana *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención son potentes inhibidores de la IL-17 en presencia y en ausencia de BAFF *in vitro*. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención son potentes inhibidores del BAFF soluble y unido a membranas en presencia y en ausencia de IL-17 *in vitro*. Los anticuerpos biespecíficos de la invención se caracterizan además por tener una afinidad de unión (K_D) por el BAFF humano en el intervalo de 150 pM a 1 pM, y por la IL-17 humana en el intervalo de 50 pM a 1 pM. Los anticuerpos biespecíficos presentan una afinidad de unión por el heterodímero IL-17A/F humano de aproximadamente 90 pM.

- 5 Los anticuerpos biespecíficos neutralizan, de modo eficaz, el BAFF soluble y también unido a membranas, y esta neutralización no se ve afectada por la presencia de cantidades saturantes de IL-17 humana. Los anticuerpos biespecíficos neutralizan, de modo eficaz, la IL-17 humana, y esta neutralización no se ve afectada por la presencia de cantidades saturantes de BAFF humano.

Expresión del anticuerpo biespecífico

- 15 Los vectores de expresión capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operablemente son muy conocidos en la técnica. Los vectores de expresión pueden codificar un péptido señal que facilita la secreción del polipéptido o polipéptidos desde la célula hospedante. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo. El primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden expresarse independientemente de los diferentes promotores a los que están unidos operablemente en un vector o, como alternativa, el primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden expresarse independientemente de los diferentes promotores a los que están unidos operablemente en dos vectores (uno expresa el primer polipéptido y el otro expresa el segundo polipéptido).

- 25 Una célula hospedante incluye células transfectadas, transformadas, transducidas o infectadas de modo estable o transitorio con uno o más vectores de expresión que expresan un primer polipéptido, un segundo polipéptido o ambos un primer polipéptido y un segundo polipéptido de la invención. La creación y el aislamiento de líneas de células hospedantes que producen un anticuerpo biespecífico de la invención puede lograrse empleando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Las células de mamífero son las células hospedantes preferidas para la expresión de los anticuerpos biespecíficos. En particular, las células de mamífero son HEK 293, NS0, DG-44, y CHO. Preferentemente, los anticuerpos biespecíficos se segregan hacia el medio en el que se cultivan las células hospedantes, del cual pueden recuperarse o purificarse los anticuerpos biespecíficos.

- 30 En la técnica se sabe que la expresión de anticuerpos en mamíferos produce glicosilaciones. Generalmente, la glicosilación aparece en la región Fc del anticuerpo en un sitio de N-glicosilación altamente conservado. Generalmente, los N-glicanos se unen a la asparagina. Cada uno de los primeros polipéptidos está glicosilado en el resto asparagina 300 de SEQ ID NO: 1.

- 35 Una secuencia polinucleotídica de ADN concreta que codifica el primer polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 es:

CAGGTGCAACTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
 ACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATTCGCCAGCCC
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATAGTGGAAGCACCAACTACAAC
 CCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTG
 AAAGTGAAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGTATTAC
 GATATTTTGACTGGTTATTATTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
 GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGC
 ACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
 ACGGTGTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCTA
 CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC
 ACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA
 GTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCCTGCCCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGGA
 CCATCAGTCTTCTGTTCCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCT
 GAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG
 TACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAAC
 AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG
 GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCC
 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAAGCGACATC
 GCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
 CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGG

CAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACA
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCTGGAGGCGGAGGATCCGGGGGAGGGGGTACCGGAGGA
GGGGGCTCGCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCA
GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGTTACAAGTTCACTGACTACCATATTCATTGGGTG
CGACAGGCCCCCTGGACAATGCCTTGAGTGGATGGGAGTAATTAATCCTACTTATGGTACT
ACTGACTACAATCAGCGGTTCAAAGGCCGTGTCACCATTACCGCGGACGAATCCACGAGC
ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCG
AGATATGATTACTTTACTGGGACGGGTGTGTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTC
TCCTCAGGTGGCGGAGGATCTGGTGGAGGTGGCTCAGGAGGTGGCGGAAGCGGCGGAGGT
GGAAGTGATATTGTGATGACTCAGACTCCACTCTCCCTGTCCGTCACCCCTGGACAGCCG
GCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTAGGAGCCTTGTACACAGTCGTGGAGAAACCTATTTA
CATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAATCTCCACAGCTCCTAATTTATAAAGTTTCCAAC
CGGTTTATTGGGGTCCCAGACAGATTCAGCGGCAGTGGGTCAGGCACAGATTTACACTG
AAAATCAGCAGGGTGGAGGCCGAAGATGTTGGGGTTTATTACTGCTCTCAAAGTACACAT
CTTCCATTACGTTTGGCTGCGGGACCAAGCTGGAGATCAAA SEQ ID NO:3.

Una secuencia polinucleotídica de ADN concreta que codifica el primer segundo que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 es:

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCT
GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCC
AGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTCCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAAGTGTGGCGGCGCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCCGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG
GAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAACACCCTGACG
CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC
5 CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

SEQ ID NO: 4.

El medio hacia el cual se ha segregado un anticuerpo biespecífico puede purificarse mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, el medio puede aplicarse y eluirse de una columna de proteína A o G empleando procedimientos convencionales. Los agregados y multímeros solubles pueden retirarse de modo eficaz por medio de técnicas habituales, que incluyen la exclusión molecular, la interacción hidrófoba, el intercambio iónico o la cromatografía de hidroxipatita. El producto puede congelarse inmediatamente, por ejemplo, a -70 °C, o puede liofilizarse.

Puede ser necesario reducir el nivel de anticuerpo biespecífico plegado de modo incorrecto presente en el medio. El anticuerpo plegado de modo incorrecto también se conoce como diacuerpo. El plegamiento incorrecto aparece cuando uno o más enlaces disulfuro se forman de modo incorrecto, tanto enlaces intercatenarios como intracatenarios. El anticuerpo biespecífico plegado de modo incorrecto puede purificarse mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, el medio que contiene el anticuerpo biespecífico plegado de modo incorrecto puede aplicarse y eluirse de una resina de intercambio catiónico fuerte. Por ejemplo, se emplea la resina de intercambio catiónico fuerte SP-Sepharose HP para purificar el anticuerpo biespecífico plegado correctamente del diacuerpo. El pH del medio que contiene el diacuerpo se ajusta a pH 8 empleando base Tris 1 M. El medio se carga en una columna de SP-Sepharose HP, se lava con 2 volúmenes de columna de Tris 20 mM, pH 8, y se eluye con Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8, en 30 volúmenes de columna (NaCl 0-70 mM). Los eluatos reunidos pueden evaluarse para el peso molecular alto frente al pico principal. Un resultado típico es una mejora de 10% de diacuerpo a 1% de diacuerpo con una recuperación del 71%.

En otro ejemplo, se emplea la resina de intercambio catiónico fuerte Poros HS 50 para purificar el anticuerpo biespecífico plegado correctamente del diacuerpo. El pH del medio que contiene el diacuerpo se ajusta a pH 8 empleando base Tris 1 M. El medio se carga en una columna de SP-Sepharose HP y se eluye con Tris 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8, en 15 volúmenes de columna (NaCl 15-50 mM). Los eluatos reunidos pueden evaluarse para el peso molecular alto frente al pico principal. Un resultado típico es una mejora de 10% de diacuerpo a 1% de diacuerpo con una recuperación del 57%.

Usos terapéuticos

Un paciente se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, con una enfermedad, un trastorno o una afección que se beneficiaría de un nivel disminuido de BAFF y/o de IL-17, o de una disminución en la bioactividad de BAFF y/o IL-17.

Tratamiento y/o tratar pretenden indicar todos los procesos en los que puede producirse un frenado, una interrupción, una detención, un control o una parada del avance de los trastornos descritos en el presente documento, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas del trastorno. Se espera que el anticuerpo biespecífico de la presente invención trate el lupus eritematoso sistémico, la nefritis lúpica, la artritis reumatoide, la psoriasis, la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica, el síndrome de Sjögren primario, o el mieloma múltiple.

Composición farmacéutica

Un anticuerpo biespecífico de la invención puede incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para la administración a un paciente. Estas composiciones farmacéuticas se diseñan para que sean apropiadas para la vía de administración seleccionada, y se emplean diluyentes, vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes dispersantes, tampones, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares, según sea apropiado. Dichas composiciones pueden diseñarse según técnicas convencionales descritas, por ejemplo, en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, que proporciona un compendio de técnicas de formulación, tal como conocen en general los expertos en la técnica. Los vehículos adecuados para las composiciones farmacéuticas incluyen cualquier material que, cuando se combina con un anticuerpo biespecífico de la invención, conserva la actividad de la molécula y no reacciona con el sistema inmunológico del paciente. Una composición farmacéutica de la presente invención comprende un anticuerpo biespecífico y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de la presente invención puede administrarse a un paciente en riesgo de padecer o que padece las enfermedades o los trastornos descritos en el presente documento empleando técnicas de administración convencionales.

Una composición farmacéutica de la invención contiene una cantidad eficaz de un anticuerpo biespecífico de la invención. Una cantidad eficaz se refiere a una cantidad necesaria (en dosificaciones y durante periodos de tiempo y para la vía de administración) para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad eficaz del anticuerpo biespecífico puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o una porción del anticuerpo para suscitar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz también es una cantidad a la cual cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo biespecífico es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

El anticuerpo biespecífico del siguiente ejemplo de expresión y demostración de las propiedades comprende dos primeros polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y dos segundos polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en los que cada uno de los primeros polipéptidos forma un enlace disulfuro intercatenario con cada uno de los segundos polipéptidos entre el resto cisteína 137 de

SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 214 de SEQ ID NO: 2, y el primer polipéptido forma dos enlaces disulfuro intercatenarios con el otro primer polipéptido entre el resto cisteína 229 del primer polipéptido de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 229 del otro primer polipéptido de SEQ ID NO: 1 y entre el resto cisteína 232 del primer polipéptido de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 232 del otro primer polipéptido de SEQ ID NO: 1, y cada uno del primer polipéptido forma un enlace disulfuro intracatenario entre el resto cisteína 22 y el resto cisteína 95 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 150 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 206 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 264 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 324 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 370 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 428 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 485 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 559 de SEQ ID NO: 1, entre el resto cisteína 507 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 707 de SEQ ID NO: 1, y entre el resto cisteína 625 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 695 de SEQ ID NO: 1, y cada uno de los segundos polipéptidos forma un enlace disulfuro intracatenario entre el resto cisteína 23 de SEQ ID NO: 2 y el resto cisteína 88 de SEQ ID NO: 2, y entre el resto cisteína 134 de SEQ ID NO: 2 y el resto cisteína 194 de SEQ ID NO: 2, y en el que cada uno de los primeros polipéptidos está glicosilado en el resto asparagina 300 de SEQ ID NO: 1. La proporción de anticuerpo biespecífico correctamente plegado a diacuerpo plegado de modo incorrecto es del orden de 90:10.

Expresión del anticuerpo biespecífico

El anticuerpo biespecífico puede expresarse y purificarse fundamentalmente como se indica a continuación. Un vector de expresión de glutamina sintasa (GS) que contiene el ADN de SEQ ID NO: 3 (que codifica el primer polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) y SEQ ID NO: 4 (que codifica la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 2) se emplea para transfectar la línea de células de hámster chino CHOK1SV (Lonza Biologics PLC, Slough, Reino Unido) mediante electroporación. El vector de expresión codifica un promotor temprano de SV (virus de simio 40E) y el gen para la GS. La expresión de GS permite la síntesis bioquímica de glutamina, un aminoácido necesario para las células CHOK1SV. Después de la transfección, las células se someten a una selección en bloque con L-metionina sulfoximina (MSX) 50 μ M. Se emplea la inhibición de GS por MSX para aumentar la rigurosidad de la selección. Las células que han integrado el ADNc del vector de expresión en regiones transcripcionalmente activas del genoma de la célula hospedante pueden seleccionarse frente a las células CHOK1SV de tipo salvaje, que expresan un nivel endógeno de GS. Las reuniones transfectadas se cultivan en placa a baja densidad para conseguir un crecimiento cercano al clonal de las células con expresión estable. Los pocillos maestros se seleccionan para la expresión del anticuerpo biespecífico y después se escalan en cultivos en suspensión sin suero para utilizarse en la producción. El medio aclarado, hacia el cual se ha segregado el anticuerpo biespecífico, se aplica a una columna de afinidad de proteína A que ha sido equilibrada con un tampón compatible, tal como disolución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). La columna se lava para eliminar los componentes de unión no específicos. El anticuerpo biespecífico unido se eluye, por ejemplo, mediante un gradiente de pH (tal como tampón fosfato de sodio 0,1 M, pH 6,8, hasta tampón citrato de sodio 0,1 M, pH 2,5). Se detectan las fracciones de los anticuerpos biespecíficos, tal como mediante SDS-PAGE o exclusión molecular analítica, y después se reúnen. Los agregados y multímeros solubles pueden retirarse de modo eficaz por medio de técnicas habituales, que incluyen la exclusión molecular, la interacción hidrófoba, el intercambio iónico o la cromatografía de hidroxipatita. El anticuerpo biespecífico puede concentrarse y/o esterilizarse por filtración empleando técnicas habituales. La pureza del anticuerpo biespecífico después de estas etapas de cromatografía es mayor que 98%. El anticuerpo biespecífico puede congelarse inmediatamente a -70 °C o conservarse a 4 °C durante varios meses.

Afinidad de unión a IL-17 y BAFF

Se determina la afinidad de unión y la estequiometría de unión del anticuerpo biespecífico a la IL-17 humana y al BAFF humano empleando un ensayo de resonancia de plasmón de superficie en un instrumento Biacore 2000 cebado con tampón de ensayo HBS-EP+ (GE Healthcare, Hepes 10 mM, pH 7,4 + NaCl 150 mM + EDTA 3 mM + tensioactivo P20 al 0,05%) y la temperatura del análisis se ajustó a 25 °C. Se utiliza un chip CM5 que contiene proteína A inmovilizada (generado empleando el acoplamiento de amina con NHS-EDC convencional) en las cuatro células de flujo (Fc) para emplear una metodología de captura. Se preparan muestras de anticuerpos a 10 mcg/ml mediante una dilución en tampón de ensayo. Se prepara la IL-17 humana o el BAFF humano a unas concentraciones finales de 20,0, 10,0, 5,0, 2,5, 1,25 y 0 (blanco) nM mediante una dilución en tampón de ensayo. Cada ciclo de análisis consiste en (1) capturar muestras de anticuerpos en células de flujo distintas (Fc2, Fc3, y Fc4), (2) inyectar 250 mcl (300-sec) de IL-17 humana o BAFF humano a todas las Fc a 50 mcl/min, (3) volver al flujo de tampón durante 20 min para controlar la fase de disociación, (4) regenerar las superficies del chip con una inyección de 5 mcl (30-sec) de glicina, pH 1,5, (5) equilibrar las superficies del chip con una inyección de 10 mcl (60-sec) de HBS-EP+. Los datos se procesan empleando un sistema de doble referencia convencional y se ajustan a un modelo de unión 1:1 empleando el software de evaluación Biacore 2000, versión 4.1, para determinar la tasa de asociación (k_{on} , unidades $M^{-1}s^{-1}$), la tasa de disociación (k_{off} , unidades s^{-1}), y $R_{m\acute{a}x}$ (unidades RU). La constante de disociación en equilibrio (K_D) se calcula a partir de la relación $K_D = k_{off}/k_{on}$, y se indica en unidades molar.

Tabla 1: Afinidad de unión a la IL-17 humana y al BAFF humano por el anticuerpo biespecífico

Antígeno	Prom. $k_{on} \pm DE \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} (10^6)$	Prom. $k_{off} \pm DE \text{ s}^{-1}$	Prom. $K_D \pm DE \text{ pM}$	n
IL-17 humana	$2,5 \pm 0,4$	$3,7 (\pm 1,8) \times 10^{-5}$	14 ± 5	3
BAFF humano	$2,3 \pm 0,9$	$1,2 (\pm 0,5) \times 10^{-4}$	60 ± 50	3

Estos resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico de la presente invención se une a la IL-17 humana y al BAFF humano.

5 Unión simultánea de IL-17 y BAFF

Se emplea el instrumento BIAcore 2000 para determinar si la IL-17 humana y el BAFF humano pueden unirse al anticuerpo biespecífico simultáneamente. Excepto cuando se indique, todos los reactivos y materiales se adquirieron en BIAcore AB (Upsala, Suecia). Todas las mediciones se realizaron a 25 °C. Se empleó el tampón HBS-EP+ (cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM, tensioactivo P-20 al 0,05% (en p/v), y HEPES 10 mM, pH 7,4) como tampón de ensayo y tampón de muestras. Se inmoviliza la proteína A sobre las células de flujo 1 y 2 de un chip detector CM4 empleando un kit de acoplamiento de amina. El anticuerpo biespecífico primero se captura sobre la célula de flujo 2, seguido de la inyección de IL-17 humana a 20 nM durante 5 min para saturar el sitio de unión a IL-17. Después de la unión de IL-17, se inyecta BAFF humano a 20 nM durante 5 min y se observa otra señal de unión. Después se regenera la superficie del chip empleando glicina 10 mM, pH 1,5. Se repite el mismo proceso, excepto con un orden diferente de IL-17 humana y BAFF humano. Se calcula la estequiometría para asegurar la saturación completa de la IL-17 humana o el BAFF humano al anticuerpo biespecífico. La estequiometría de la IL-17 humana al anticuerpo biespecífico generalmente es de aproximadamente 1,3, basada en un experimento de unión cinética. De modo similar, la estequiometría del BAFF humano al anticuerpo biespecífico generalmente es de aproximadamente 1,0, basada en un experimento de unión cinética. El Ab de BAFF control es 4A5-3.1.1-B4 del documento US7.317.089. El Ab de IL-17 control es Fab 126 del documento US7.838.638.

Tabla 2: Unión simultánea de la IL-17 humana y del BAFF humano al anticuerpo biespecífico

Anticuerpo	Primer analito	ΔUR	Segundo analito	ΔUR
Biespecífico	BAFF	22	IL-17	11
Biespecífico	IL-17	15	BAFF	23
Ab de IL-17	BAFF	0	IL-17	32
Ab de IL-17	IL-17	16	BAFF	0
Ab de BAFF	BAFF	33	IL-17	0
Ab de BAFF	IL-17	0	BAFF	32

Estos resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico de la presente invención puede unirse a la IL-17 humana y al BAFF humano simultáneamente, tal como se demuestra por el aumento en las unidades de respuesta (ΔUR) de la unión de los dos ligandos al anticuerpo biespecífico.

Inhibición de la producción de CXCL1 inducida por IL-17 en células HT-29 in vitro

Las células HT-29 son células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal humano que expresan de modo natural el receptor de IL-17. La incubación de células HT29 con IL-17 humana da como resultado la producción de CXCL1, que puede medirse empleando un ELISA disponible en el mercado.

Se evalúa un intervalo de dosis del anticuerpo biespecífico de 41200 a 2,64 pM (la concentración final se basa en el PM monomérico del anticuerpo biespecífico (=100 kDa)). Después se añade cada concentración de ensayo del anticuerpo biespecífico (50 nM) a pocillos que contienen IL-17 recombinante (la concentración final de la IL-17 en el pocillo es de 3,75 nM (basada en el PM monomérico de IL-17 (=16 kDa))). El ensayo se realiza en pocillos por triplicado por tratamiento. Se emplea medio de ensayo para los controles de "solo medio" y "solo IL-17". Se utiliza un anticuerpo neutralizante de IL-17 (Fab 126 del documento US7.838.638) como control positivo en el ensayo.

Las placas que contenían las mezclas de IL-17 y anticuerpo se incuban durante 60 a 90 minutos a 37 °C, humedad relativa del 95%, CO₂ al 5% en los pocillos interiores de las placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido. En una variación de este ensayo, se añade una concentración saturante de BAFF humano (concentración final de 1,25 nM basada en el PM monomérico de BAFF (=20 kDa)), con el objetivo de determinar si el anticuerpo biespecífico aún es capaz de neutralizar la IL-17 cuando está simultáneamente unido al BAFF. Se cultivaron células HT-29 del modo habitual en medio de ensayo (5A de McCoy que contiene FBS al 10%, penicilina G (0,2 U/ml) y estreptomicina (0,2 mcg/ml)). En el día del ensayo, las células se enjuagan con HBSS y se desprenden de los matraces de cultivo con tripsina + EDTA. La tripsina se inactiva con medio de ensayo. Después, las células HT-29 se centrifugan a 500 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento celular se resuspende en medio de ensayo. Se mide la densidad celular con un hemocitómetro, y se añaden 20.000 células HT-29 (en 100 mcl) a las placas de 96 pocillos que contienen la mezcla de anticuerpo/IL-17. Se añaden 200 mcl de PBS a cada uno de los pocillos de los bordes que no se han utilizado (sin células) para reducir los efectos del borde que surgen de la evaporación. Las placas de 96 pocillos se colocan en un incubador de cultivos de tejidos (37 °C, humedad relativa del 95%, CO₂ al 5%) durante aproximadamente 48 horas.

Al final del ensayo, las placas se centrifugan (500 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente), y el medio de cultivo celular se traslada a placas de 96 pocillos de polipropileno, que se sellan y se congelan a -80 °C. En el día de la medición de CXCL1 mediante ELISA, las placas se descongelan a temperatura ambiente. Se miden los niveles de CXCL1 en el medio (no diluido o diluido 1:3) con un ELISA de "sándwich" para CXCL1 (R&D Systems DuoSet n.º DY275), según las instrucciones del fabricante, empleando los siguientes tampones y modificaciones: 1X tampón de lavado de ELISA de BioFX Labs (desde 10X, n.º WSHW-1000-01); volumen de muestra y de patrón de 50 mcl por pocillo; sustrato de BioFX Labs (sustrato de HRP de un componente, n.º TMBW-1000-01); una disolución de detención de BioFX Labs (n.º LSTP-1000-01; 100 mcl por pocillo). Al final de las reacciones de ELISA, las placas se leyeron a 450 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices SpectraMax 190). Los datos se recogen como el porcentaje de la cantidad máxima de CXCL1 producido (siendo del 100% solo con IL-17). Se calcula la concentración en la que 50% de la respuesta inducida por IL-17 es inhibida (CI₅₀) por el anticuerpo biespecífico o el control positivo, empleando un ajuste sigmoide de 4 parámetros de los datos (GraphPad Prism).

Los resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico de la presente invención inhibe la secreción inducida por IL-17 de CXCL1 por las células HT-29 de una manera dependiente de la concentración. La inhibición es comparable a la observada con el anticuerpo de control positivo (con una CI₅₀ para el anticuerpo biespecífico de $2,00 \pm 0,21$ nM frente a $1,86 \pm 0,22$ nM para el anticuerpo de control positivo (promedio de 3 experimentos independientes $\pm$ PEE)), mientras que el anticuerpo de control negativo no inhibió la proliferación. Además, se observó una inhibición similar en presencia de una cantidad saturante de BAFF, con una CI₅₀ para el anticuerpo biespecífico de $1,57 \pm 0,45$ nM frente a $1,41 \pm 0,50$ nM para el anticuerpo de control positivo (promedio de 3 experimentos independientes $\pm$ PEE). El anticuerpo biespecífico de la presente invención neutraliza con eficacia la IL-17 y esta neutralización no se ve afectada por la presencia de cantidades saturantes de BAFF.

Inhibición de la proliferación inducida por BAFF de células T1165 in vitro

T1165.17 es una línea celular de plasmacitoma murino que depende de factores externos (IL-1 β o BAFF) para su supervivencia y crecimiento. Estas células expresan de modo natural el receptor para BAFF, y su respuesta al BAFF humano se mide controlando su proliferación.

Se evalúa un intervalo de dosis del anticuerpo biespecífico de 1 nM a 4,1 pM (la concentración final se basa en el PM monomérico del anticuerpo biespecífico (=100 kDa)) para la capacidad para neutralizar el BAFF soluble (la concentración final de BAFF soluble en el ensayo es de 150 pM basada en el PM monomérico de BAFF (=20 kDa)). Se incuban diversas concentraciones de anticuerpo biespecífico con BAFF soluble durante 30-60 minutos a 37 °C en los pocillos interiores de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos de fondo plano en un volumen total de 50 mcl. Se emplea un anticuerpo neutralizante de BAFF (4A5-3.1.1-B4 del documento US7.317.089) como control positivo en el ensayo. Cada condición se ensaya por triplicado. En una variación de este ensayo, se ensaya la capacidad del anticuerpo biespecífico para neutralizar el BAFF de membrana. Se incuban diversas concentraciones de anticuerpo biespecífico con la fracción de las membranas de células HEK293 que expresan una forma no rompible de BAFF (la cual se logra mutando el sitio de ruptura de furina en BAFF, que provoca la expresión permanente de BAFF sobre las membranas celulares). En otra variación de este ensayo, se añade una concentración saturante de IL-17 humana (concentración final de 15,6 nM, basada en el PM monomérico de IL-17 (=16 kDa)), con el objetivo de determinar si el anticuerpo biespecífico aún es capaz de neutralizar el BAFF soluble o de membranas cuando está simultáneamente unido a la IL-17.

Se cultivan células T1165 del modo habitual en medio de ensayo (RPMI1640 que contiene FBS al 10%, HEPES, L-glutamina, piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M, 1X antibiótico-antimicótico) suplementado con IL-1 β humana recombinante 2 ng/ml. En el día del ensayo, las células se lavan 3 veces con medio de ensayo y se resuspenden hasta 1×10^5 células/ml en medio de ensayo. Se añaden 50 mcl de la suspensión de células a la

placa de 96 pocillos que contiene la mezcla de anticuerpo y BAFF. Se añaden 100 µl del medio de ensayo a cada uno de los pocillos de los bordes que no se han utilizado (sin células) para reducir los efectos del borde que surgen de la evaporación. Las placas se colocan en un incubador de cultivos de tejidos (37 °C, humedad relativa del 95%, CO₂ al 5%) durante aproximadamente 44 horas. Al final del ensayo se añaden 20 µl de la disolución Promega Cell Titer 96 Aqueous One Solution a cada pocillo y se incuba durante 1 a 4 horas a 37 °C. Las placas se leen a 490 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices SpectraMax 190). Los datos se recogen como el porcentaje de inhibición, empleando los pocillos sin BAFF como la respuesta mínima y los pocillos con BAFF 150 pM como la respuesta máxima. Se calcula la concentración en la que 50% de la respuesta inducida por BAFF es inhibida (CI₅₀) por el anticuerpo biespecífico o el control positivo, empleando un ajuste sigmoidal de 4 parámetros de los datos (SigmaPlot).

Los resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico inhibe la proliferación inducida por BAFF de células T1165 de una manera dependiente de la concentración. Esta inhibición es comparable a la observada con el anticuerpo de control positivo (con una CI₅₀ para el anticuerpo biespecífico de $0,064 \pm 0,021$ pM frente a $0,071 \pm 0,002$ pM para el anticuerpo de control positivo (promedio de 2 experimentos independientes $\pm$ PEE)), mientras que el anticuerpo de control negativo no inhibió la proliferación. Además, se observó una inhibición similar en presencia de una cantidad saturante de IL-17, con una CI₅₀ para el anticuerpo biespecífico de $0,060 \pm 0,014$ pM frente a $0,073 \pm 0,012$ pM para el anticuerpo de control positivo (promedio de 2 experimentos independientes $\pm$ PEE). El anticuerpo biespecífico neutraliza, de modo eficaz, el BAFF, y esta neutralización no se ve afectada por la presencia de cantidades saturantes de IL-17.

También se demuestra la capacidad del anticuerpo biespecífico para inhibir la proliferación de células T1165 inducida por BAFF unido a la membrana. El anticuerpo biespecífico de la presente invención neutraliza con eficacia la proliferación inducida por el BAFF unido a la membrana de una manera similar al anticuerpo de BAFF de control positivo (4A5-3.1.1-B4 del documento US7.317.089). Además, se observó una inhibición similar en presencia de una cantidad saturante de IL-17.

Inhibición de la producción de CXCL1 inducida por IL-17 humana in vivo

Una inyección de IL-17 humana conduce a un aumento rápido y transitorio de CXCL1 de ratón en la circulación. Ratones hembra normales C57B16 (n = 8 por grupo) fueron inyectados SC con el anticuerpo biespecífico (66 mcg/ratón), o con un anticuerpo anti-IL-17 de control positivo (Fab 126 del documento US7.838.638, 50 mcg/ratón) o con un anticuerpo de control negativo (hulG4, 50 mcg/ratón). Dos días después, los ratones recibieron una única inyección IP de IL-17 humana (3 mcg/ratón) y, 2 horas después, se recoge el suero y se conserva a -80 °C hasta el análisis. La concentración de CXCL1 se determina mediante ELISA. Se revisten placas de microtitulación con un anticuerpo que captura Fc humano (Jackson ImmunoResearch 109-005-098, 1 mcg/ml) y se incuban durante la noche a 4 °C. Las placas se lavan, se bloquean con caseína y se añaden 100 µl de suero (dilución 1:1000). Las placas se incuban durante 2 h a temperatura ambiente, se lavan y se añade un anticuerpo de detección marcado con HRP (anti-IgG humana, Jackson ImmunoResearch 709-035-149). Las placas se incuban durante 1 h a temperatura ambiente, se lavan y se revelan empleando sustrato de TMB y se leen empleando un lector de placas. La concentración se calcula basándose en curvas patrón apropiadas.

Tabla 3: Niveles de CXCL1 inducidos por IL-17 después de la exposición al anticuerpo biespecífico

Ab dosificado	Control neg.	Control neg.	Control posit.	Anticuerpo biespecífico
Ligando	PBS	IL-17	IL-17	IL-17
PROMEDIO pg CXCL1/ml	45,06	1071,17	482,73	387
PEE	45,06	141,67	263,7	175,11
Valor p			<0,01	<0,01

Estos datos confirman que la IL-17 humana produce un aumento en los niveles séricos de CXCL1. Sin embargo, en presencia del anticuerpo biespecífico, estos resultados demuestran que el aumento de CXCL1 inducido por IL-17 se reduce ($P < 0,01$, ANOVA) con relación a animales que reciben el anticuerpo de control negativo. La reducción en CXCL1 con el anticuerpo biespecífico es comparable con la observada con el anticuerpo anti-IL-17 de control positivo. Se confirma la exposición equivalente al anticuerpo biespecífico y a los anticuerpos de control positivo y negativo dentro de cada grupo por medio de un ELISA cuantitativo. Por tanto, el anticuerpo biespecífico de la presente invención neutraliza con eficacia los efectos biológicos inducidos por la IL-17 humana en ratones. La determinación del valor p se compara con el grupo de control negativo/IL-17.

Inhibidor del BAFF humano in vivo

Los ratones que portan un transgén que codifica la BAFF humana soluble tienen un número anormalmente elevado de linfocitos B en el bazo.

5 Ratones transgénicos para BAFF humano (n = 5 por grupo) fueron inyectados IP con una única dosis de anticuerpo biespecífico (660 mcg/ratón), o con un anticuerpo anti-BAFF de control positivo (4A5-3.1.1-B4, documento US7.317.089, 500 mcg/ratón) o con un anticuerpo de control negativo (hulG4, 500 mcg/ratón). Ocho días después se recogió el suero y los bazos. Se prepararon suspensiones de células individuales de células esplénicas y se determina el número total de leucocitos después de lisar los eritrocitos. Se determina el porcentaje relativo de linfocitos B empleando el marcador de la superficie celular B220 mediante citometría de flujo. Se calcula el número total de células B por bazo multiplicando el porcentaje de células B220 positivas por el número total de linfocitos en el bazo. Se revisten placas de microtitulación con un anticuerpo que captura Fc humano (Jackson ImmunoResearch 109-005-098, 1 mcg/ml) y se incuban durante la noche a 4 °C. Las placas se lavan, se bloquean con caseína y se añaden 100 µl de suero (dilución 1:5000). Las placas se incuban durante 2 h a temperatura ambiente, se lavan y se añade un anticuerpo de detección marcado con HRP (anti-IgG humana, Jackson ImmunoResearch 709-035-149). Las placas se incuban durante 1 h a temperatura ambiente, se lavan y se revelan empleando sustrato de TMB y se leen empleando un lector de placas. La concentración se calcula basándose en curvas patrón apropiadas.

Tabla 4: Número de células en el bazo de ratones transgénicos para BAFF humano después de la exposición al anticuerpo biespecífico

Ab dosificado	Control neg.	Control posit.	Anticuerpo biespecífico
PROMEDIO número X 10E6 células B/bazo	234,84	78,87	94,77
PEE	18,93	3,49	2,34
Valor p		<0,0001	<0,0001

20 Estos resultados demuestran que el número de células B en los bazos de ratones transgénicos para el BAFF humano se ha reducido ($p < 0,0001$, ANOVA) por una única administración del anticuerpo biespecífico. Esta normalización del número de células B es equivalente a la observada con el anticuerpo de BAFF de control positivo. Se confirma la exposición equivalente al anticuerpo biespecífico y a los anticuerpos de control positivo y negativo dentro de cada grupo por medio de un ELISA cuantitativo. Por tanto, el anticuerpo biespecífico de la presente invención neutraliza con eficacia los efectos biológicos inducidos por el BAFF humano en ratones. La determinación del valor p se compara con el grupo de control negativo.

Análisis de la solubilidad y la estabilidad

30 El anticuerpo biespecífico se formula en PBS a pH 7,4. El anticuerpo biespecífico se concentra desde 1-2 mg/ml hasta una concentración que varía de 52 mg/ml a 58 mg/ml empleando concentradores Amicon. Las muestras concentradas se conservan a 25 °C a lo largo de un periodo de 4 semanas. Las muestras se analizan para el porcentaje de peso molecular alto (%PMA) con una cromatografía de exclusión molecular (CEM) a la concentración inicial y con las incubaciones del día 1, la semana 1, y la semana 4. La CEM se realiza en un sistema Agilent 1100 utilizando una columna TSK G3000SW-XL (Tosoh Bioscience). Se emplea PBS + NaCl 0,35 M, pH 7,4, como fase móvil empleada a 0,5 ml/min durante 35 minutos. Se inyecta un volumen de 1 µl del anticuerpo concentrado a la columna y se mide la detección a 280 nm. Los cromatogramas se analizan empleando una ChemStation y se calcula el porcentaje de peso molecular alto (PMA) empleando la tasa de ABC (área bajo la curva) de los picos eluidos antes del pico del monómero frente al ABC total. Se analizan las muestras conservadas a 25 °C en diferentes momentos para el %PMA y los resultados se resumen en la tabla 5.

Tabla 5: Resumen del porcentaje de especies de peso molecular alto medido mediante SE-HPLC

	%PMA mediante SE-HPL
Inicial, no concentrado	0,95
Inicial, concentrado	1,63
1 día, 25 °C	1,81

40

(continuación)

	%PMA mediante SE-HPL
1 semana, 25 °C	2,61
4 semanas, 25 °C	5,35

Estudios preliminares con un anticuerpo biespecífico de partida que comprende un anticuerpo de BAFF del documento WO2003016468 y un anticuerpo de IL-17 del documento WO2007070750 demostraron que, después de una concentración de tan solo 6 mg/ml, se detecta un aumento de 25% en el porcentaje de especies de PMA mediante SE-HPLC después de 3 semanas de conservación a 4 °C en PBS y, a 30 mg/ml, el aumento en el porcentaje de especies de PMA fue del 15% después de solo 2 días de conservación a 4 °C en PBS. Estos resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico de la presente invención presenta propiedades altamente mejoradas, que incluyen una disminución en la agregación y un aumento en la estabilidad física, frente al anticuerpo biespecífico de partida.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que comprende dos primeros polipéptidos y dos segundos polipéptidos, en el que la secuencia de aminoácidos del primer polipéptido es SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido es SEQ ID NO: 2.
- 5 2. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1, en el que está presente un enlace disulfuro intracatenario entre el resto cisteína 507 de SEQ ID NO: 1 y el resto cisteína 707 de SEQ ID NO: 1.
3. Un anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1 o 2 para su uso en terapia.
4. Un anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, artritis reumatoide, psoriasis, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Sjögren primario o mieloma múltiple.
- 10 5. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1 o 2, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.