

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 767**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
C07K 16/24	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
C12N 5/12	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2010 PCT/GB2010/000639**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.10.2010 WO10116123**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010 E 10712110 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2417161**

54 Título: **Anticuerpos contra IL-17BR**

30 Prioridad:

06.04.2009 GB 0905972
06.04.2009 US 166808 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2017

73 Titular/es:

MEDICAL RESEARCH COUNCIL (100.0%)
20 Park Crescent
20 Park Crescent London W1B 1AL, GB

72 Inventor/es:

MCKENZIE, ANDREW, NEIL, JAMES y
NEILL, DANIEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 633 767 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra IL-17BR

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión de los mismos, dirigidos contra el receptor de interleucina 17B (IL-17BR).

10 **Antecedentes de la invención**

El asma es un trastorno inflamatorio crónico habitual de las vías respiratorias. El número de personas que lo padecen ha aumentado de forma espectacular en las últimas décadas y la Organización Mundial de la Salud estima que del orden de 300 millones de personas en todo el mundo padecen asma. El asma alérgica se caracteriza por una hiperrespuesta de las vías respiratorias (AHR, siglas por su traducción al inglés *airways hyperresponsiveness*) incontrolable, inducida por diversos estímulos provocadores y está asociada a infiltrados inflamatorios de tipo 2 en los pulmones.

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por las siglas *inflammatory bowel disease*) es una inflamación crónica que afecta a la capa mucosa del colon (también conocida como intestino grueso), que incluye dos patologías: colitis ulcerosa (UC, *ulcerative colitis*) y enfermedad de Crohn (CD, *Crohn's disease*). Las terapias convencionales para el tratamiento de IBD implican o bien antibióticos o bien fármacos derivados de esteroides o agentes anti-TNF- α ; sin embargo, de momento, no se ha logrado con ellas inducir o mantener la remisión clínica en los pacientes (Hanauer et al., 2008). Se cree que UC es una enfermedad mediada por Th2, habiéndose demostrado con un modelo de ratón representativo que las citocinas de tipo 2 están relacionadas con el desarrollo de inflamación intestinal (Heller et al., 2002).

El receptor de interleucina-17B, conocido en sus variedades como IL-25R, IL-17BR, IL-17RB o IL-17RH1 se identificó por primera vez en una base de datos de marcadores de secuencia expresada por su homología con el receptor IL-17A (IL-17RA) (Tian et al., 2000). Más adelante, se demostró que IL-17BR se unía tanto a IL-17B como a IL-25 (Lee et al., 2001; Shi et al., 2000; Tian et al., 2000). IL-25 se une a IL-17BR con una afinidad más potente (1,4 nM) que IL-17B (7,6 nM).

La IL-25, un miembro de la familia de citocinas IL-17 (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17F – asociado a la inflamación de tipo 1) difiere notablemente de otros miembros de la familia IL-17 por el hecho de que su producción induce expresión de citocina de tipo 2 asociada con esplenomegalia, niveles elevados de IgG1 e IgE en suero y cambios patológicos en los pulmones y el tracto digestivo, incluyendo infiltrados eosinófilos, aumento de la secreción de moco e hiperplasia de células epiteliales (Fort et al., 2001; Lee et al., 2001; Moseley et al., 2003; Pan et al., 2001). La ablación genética de IL-25 o el uso de anticuerpos anti-IL-25 bloqueantes han demostrado claramente la importancia de IL-25 en la protección contra la infección por helmintos (Fallon et al., 2006; Owyang et al., 2006), así como su papel crucial en la regulación de las respuestas características de asma (Ballantyne et al., 2007). Parece ser que IL-25 estimula estas respuestas gracias a su capacidad para inducir la liberación de citocinas de tipo 2, como IL-13, inicialmente desde células que no son linfocitos B ni linfocitos T innatas (NBNT) (Fallon et al., 2006; Fort et al., 2001) y posteriormente de la respuesta de linfocito T adaptativa (Angkasekwinai et al., 2007; Wang et al., 2007).

Se ha identificado el mensaje *il17br* en bibliotecas desde pulmón, cerebro, páncreas, riñón, tiroides y eosinófilos (Lee et al., 2001; Shi et al., 2000). Parece ser que la expresión en las células del músculo liso de los pulmones está regulada inmúnológicamente (Lajoie-Kadoch et al., 2006).

En correspondencia con el papel que desempeña en el asma, se ha detectado ARNm o proteína de IL-25 a partir de diversos tipos de células que se encuentran en el pulmón, incluyendo macrófagos alveolares, mastocitos, eosinófilos y basófilos (Wang et al., 2007). Más recientemente, la producción de células epiteliales de pulmón de ratón y de ser humano estimuladas con alérgeno ha corroborado el posible papel de IL-25 en la modulación de las respuestas pulmonares alérgicas (Angkasekwinai et al., 2007). Por otra parte, se ha notificado que IL-25 induce la producción inflamatoria de citocina y quimiocinas a partir de fibroblastos de pulmón y componentes de la matriz extra-celular de células del músculo liso de las vías respiratorias. Por otra parte, estudios recientes han indicado que los transcritos de IL-25 e IL-17BR se regulan a la alza de forma significativa en tejido de biopsia de pacientes asmáticos asociado con infiltración eosinófila (Wang et al., 2007). El tratamiento de ratones sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) con un anticuerpo monoclonal bloqueante dirigido contra IL-25 tiene como resultado una reducción de AHR y menores concentraciones de IL-13 en el lavado broncoalveolar como respuesta al desafío con OVA y la administración de metacolina.

Recientemente, Rickel et al. (J Immunol 181, 4299-4310 (2008)) han utilizado anticuerpo monoclonal bloqueante contra IL-17RA humano para prevenir la actividad de IL-25 en un ensayo basado en células humanas primarias. Se

ha demostrado con ello que la actividad de IL-25 requiere tanto IL-17BR como IL-17RA. Sin embargo, se ha notificado asimismo que IL-17A e IL-17F señalizan a través de un complejo heteromérico que contiene IL-17RA e IL-17RC.

- 5 Rickel *et al.* describen también un anticuerpo reactivo con IL-17BR de ratón que bloquea la inflamación de pulmón inducida por IL-25 en un modelo de ratón con asma alérgica. Hasta la fecha, no se ha notificado ningún anticuerpo reactivo con IL-17BR humano.

10 En correspondencia con su papel en IBD, se ha observado la producción de IL-25 en un modelo experimental de colitis crónica en ratón, en asociación con un cambio de respuesta de tipo Th1 a Th2 (Fichtner-Feigl *et al* 2008) y se observó una alta expresión de ARNm de IL-25 en todo el tracto gastrointestinal de ratones (Fort *et al.*, 2001). Asimismo, el gen de IL-25 está localizado dentro de una región de susceptibilidad de enfermedad de Crohn en el cromosoma 14 de seres humanos, si bien su posible asociación con la enfermedad está todavía por investigarse (Buning *et al.* 2003).

15

Divulgación de la invención

La presente invención proporciona moléculas de anticuerpo, ácidos nucleicos aislados, métodos de producción de moléculas de anticuerpos, composiciones y moléculas de anticuerpos para su uso en métodos de tratamiento terapéutico, tal como se expone en las reivindicaciones.

20

Los autores de la presente invención han identificado una molécula de anticuerpo que se une con alta afinidad y especificidad a IL-17BR.

- 25 Las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento pueden ser útiles para bloquear la bioactividad de IL-25 *in vivo* y prevenir la inflamación de las vías respiratorias, AHR, y la inflamación del colon.

30 Se ha demostrado que la administración de una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento en ratones desafiados con antígeno reduce los niveles de IL-13 e IL-5, ambas citocinas críticas en la regulación del asma, y que reduce el número de células que producen IL-13 en los pulmones a niveles y números similares a los que se observan en ausencia de desafío con antígeno o en ratones con déficit de IL-17BR desafiados con antígeno. Las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento también pueden reducir significativamente la hiperreactividad de las vías respiratorias. Asimismo, las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento pueden reducir *in vivo* la expansión de linfocitos T gamma/delta relacionada con la enfermedad. Esto indica que las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento inhiben dos rutas aceptadas como esenciales en el desarrollo del asma: la producción de IL-13 y la capacidad de respuesta de linfocitos T gamma/delta.

35

40 Se desafió a los ratones antes descritos desafiados con antígeno con antígeno ovoalbúmina (OVA) en un modelo de asma experimental. Se demuestra que la administración de una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento en ratones desafiados con antígeno OXA (oxazolona) en un modelo experimental de IBD reduce la tasa de mortalidad y los signos clínicos de IBD, tales como la pérdida de peso y el acortamiento del colon como consecuencia de la inflamación y la hemorragia.

40

45 Las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento pueden presentar reacción cruzada tanto con IL-17BR murino como humano y pueden inhibir la unión de IL-25 humana con IL-17BR humano. Por lo tanto, las moléculas de anticuerpo pueden ser utilizadas en modelos de ratón para investigar sus mecanismos de acción *in vivo*. Asimismo, las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento pueden bloquear la acción biológica del complejo IL-25/IL-17BR en células humanas. Las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento tienen por tanto una posible utilidad para el tratamiento de enfermedades tales como asma.

50

En un aspecto de la divulgación, se proporciona una molécula de anticuerpo que se une a IL-17BR y que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR3 VH con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

55 Preferentemente, una molécula de anticuerpo bloquea la unión de IL-17BR a IL-25 y reduce o inhibe al menos una AHR mediada por IL-25; la producción de IL-13; la producción de IL-5 medida por IL-25; la producción de IL-8 medida por IL-25 y la expansión y filtración de linfocitos T gamma/delta.

55

Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH que comprende una CDR3 de VH de SEQ ID NO: 7 junto con una CDR1 de SEQ ID NO: 5 y una CDR2 de SEQ ID NO: 6.

60

Un dominio VH puede estar apareado con un dominio VL, por ejemplo un dominio VL con una CDR1 de SEQ ID NO: 8, una CDR2 de SEQ ID NO: 9 y una CDR3 de SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, un dominio VH puede estar apareado con un dominio VL de SEQ ID NO: 4.

En algunos casos, una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH que comprende una CDR1 de VH de SEQ ID NO: 5, una CDR2 VH de SEQ ID NO: 6 y una CDR3 VH de SEQ ID NO: 7 y un dominio VL que comprende una CDR1 VL de SEQ ID NO: 8, una CDR2 VL de SEQ ID NO: 9 y una CDR3 VL de SEQ ID NO: 10.

5 Un dominio VH puede comprender además regiones marco, humanas y no humanas, como por ejemplo, las regiones marco que se presentan en SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo puede comprender el dominio VH de SEQ ID NO: 2.

10 Un dominio VL puede comprender además regiones marco, humanas o no humanas, como por ejemplo la región marco que se presenta en SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo puede comprender el dominio VL de SEQ ID NO: 4.

15 En algunos casos, la molécula de anticuerpo puede comprender el dominio VH de SEQ ID NO: 2 y el dominio VL de SEQ ID NO: 4.

Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan también un ácido nucleico aislado que codifica la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento, vectores que comprenden dicho ácido nucleico y métodos para expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped para producir moléculas de anticuerpo.

20 La divulgación proporciona además el uso de moléculas de anticuerpo de la invención, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica, para el tratamiento de enfermedades, como por ejemplo enfermedades mediadas por IL-25, tales como alergia, asma y colitis.

25 Éstos y otros aspectos de la invención se describen con mayor detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos adjuntos.

Descripción de las figuras

30 La Figura 1 muestra que el clon D9.2 anti-IL-17BR presenta reacción cruzada para la unión de IL-17BR humano y murino por ELISA. Las barras muestran la unión de medios (barras blancas) o clon de anticuerpo D9.2 (barras negras) para IL-17BR-Fc murina inmovilizada, IL-17BR-Fc humana o IgG humana de control.

35 La Figura 2 muestra la unión de D9.2 a IL-17BR en células COS7 transfectadas y células de ratón primarias. Las células COS7 transfectadas con vectores de expresión de IL-17BR murino (a) o humano (b) expresan IL-17BR que es reconocido por D9.2. Se incubaron las células con 1 µg/ml de D9.2 durante 20 minutos y después se lavaron. Se detectó la unión de D9.2 por FACS transcurridos 20 minutos de incubación con FITC IgG anti-ratón a 0,5 µl/ml. (c) Células Th2 diferenciadas *in vitro* expresan IL-17BR y están unidas mediante D9.2. La expresión es baja o ausente en células Th1. (d) Tras tres dosis intraperitoneales diarias consecutivas de 400 ng de IL-25, una población de células que no son linfocitos T ni linfocitos B (NBNT) que expresa IL-17BR aparece en el ganglio linfático mesentérico de ratones de tipo silvestre (d, e) pero no en ratones con silenciamiento de IL-17BR (d,f). Esta población es reconocida por D9.2 y produce IL-13.

45 La Figura 3 muestra la unión de D9.2 a IL-17BR pero no reacciona en reacción cruzada con IL-17RA, IL-17RC o IL-17RD de ratón o humano. Brevemente, se revistieron placas ELISA con miembros de la familia IL-17R; IL-17RA, IL-17BR, IL-17RC o IL-17RD o control IL-13Rα, a 2 µg/ml, se incubaron durante toda la noche a 4 °C, se lavaron en PBS/0,05 % tween y se bloquearon en PBS/10 % FCS a temperatura ambiente durante 4 horas. Se detectó la unión de D9.2 biotinilado utilizando estreptavidina-HRP y solución de revelado ELISA y midiendo la absorbancia a 405 nm.

50 La Figura 4 muestra que el anticuerpo monoclonal de ratón D9.2, pero ningún otro anticuerpo anti-IL-17BR monoclonal de ratón (3b9, 2c1, 5h9, 7e1, 10c6, 10e6), inhibe la unión de IL-25 humano al receptor IL-25 humano. Se diluyó cada anticuerpo monoclonal de ratón purificado (x 100) en hIL17Br/Fc (100 ng/ml) hasta una concentración final de 1 µg/ml en una solución de hIL17Br/Fc a 100 ng/ml. Brevemente, se añadió una mezcla de [anticuerpo x hIL17Br/Fc] a placas revestidas con IL-25 humano y se incubaron durante 1 hora y 30 minutos y se lavó tres veces. Se añadió conjugado (Fc)-HRP anti-hIgG (Serotec) a la placa y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente, se lavó tres veces y se reveló con TMB. Se detuvo la reacción con IM HCl. Se realizó la lectura de la densidad óptica a 450 nm y se sustrajo la lectura del blanco de reactivos de todas las lecturas.

60 La Figura 5 muestra que los anticuerpos de D9.2 bloquean la producción de IL-13 *in vitro* de células NBNT y linfocitos CD4⁺ (T y/o NKT). (a) célula NBNT. Brevemente, se extirparon los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones BALB/c no tratados previamente y con empobrecimiento de linfocitos CD3⁺ y CD19⁺. Se colocaron en placa células NBNT en placas de 96 pocillos de fondo redondo, a 3 x 10⁵ células/pocillo, y se incubaron durante 72 horas en RPMI 10% en solitario (Medios) o RPMI 10 % FCS con 10 ng/ml IL-25 (IL-25). Se añadió D9.2 a los pocillos en diluciones en serie desde una concentración máxima de 2 µg/ml y se incubaron durante 1,5 horas antes de añadir 10 ng/ml IL-25 a los pocillos. A continuación, se incubaron las placas a 37°C durante 72 horas antes de examinar los sobrenadantes para determinar el contenido de IL-13 por ELISA. (b) linfocito CD4⁺ (T y/o

NKT). Se tomaron los bazo de ratones BALB/c de tipo silvestre sin tratar previamente y se preparó una única suspensión de células. Se cultivaron los linfocitos CD4⁺ aislados, a 1×10^6 células/ml, en placas de 96 pocillos o bien en RPMI en solitario o bien en RPMI suplementado con 10 ng/ml IL-25 con y sin D9.2 a 1 µg/ml. Se cultivaron las células durante 72 horas antes de recoger los sobrenadantes para analizar los niveles de proteína IL-13 por ELISA.

La Figura 6 muestra que D9.2 inhibe la producción de KC inducida por IL-25 (ratón IL-8) de una línea celular de carcinoma renal de ratón (RENCA) dependiendo de la dosis. Se pre-incubó IL-25 (100 ng/ml) con diversas concentraciones de D9.2 o anticuerpo de control IgG1 durante 30-60 minutos a temperatura ambiente antes de la adición a las células. Se añadió TNF-α (10 ng/ml) a placas revestidas con células RENCA inmediatamente antes de añadir la mezcla de proteína IL-25 /D9.2. Se incubaron muestras de control sin anticuerpo con 100 ng/ml de IL-25 y 10 ng/ml TNF-α (IL-25 + TNF-α) o solamente medio como control (Medios) durante 24 horas antes de añadirlo a las células. Se llevó a cabo la determinación de la liberación de KC por ELISA transcurridas 24 horas desde la estimulación.

La Figura 7 muestra que D9.2 inhibe la producción de IL-8 inducida por IL-25 –de una línea celular de carcinoma renal humano (TK-10) dependiendo de la dosis. Se incubó previamente IL-25 (100 ng/ml) con diversas concentraciones de D9.2 o anticuerpo de control IgG1 durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. Se añadió TNF-α (10 ng/ml) a placas revestidas con células TK-10 inmediatamente antes de la adición de la mezcla de proteína IL-25 /D9.2. Se incubaron muestras de control sin anticuerpo con 100 ng/ml de IL-25 y 10 ng/ml TNF-α (IL-25 + TNF-α), o medio solamente como control (Medios) durante 24 horas antes de añadirlo a las células. Se llevó a cabo la determinación de la liberación de IL-8 por ELISA a las 24 horas de la estimulación.

La Figura 8 muestra que D9.2 bloquea las respuestas IL-25 *in vivo*. (a) Células de ganglio linfático mediastinal de ratones sensibilizados y desafiados de ovoalbúmina (OVA) producen IL-13 cuando se las vuelve a estimular con OVA *in vitro*. La administración de D9.2 antes del desafío con OVA reduce la respuesta IL-13 a niveles comparables con los de ratones KO IL-17BR. (b) Células de ganglio linfático mediastinal de ratones sensibilizados y desafiados con OVA producen IL-5 cuando se las vuelve a estimular con OVA *in vitro*. La administración de D9.2 antes del desafío con OVA reduce la respuesta IL-5 a niveles comparables con los de ratones KO IL-17BR. (c) El tratamiento con D9.2 redujo el número de células que producen IL-13 en el pulmón de ratones sensibilizados y desafiados con OVA. El manchado de citocina intracelular de IL-13 revela una población de células que producen IL-13 en ratones sensibilizados y desafiados con OVA que está ausente en ratones KO IL-17BR y es reducida en animales tratados con anticuerpo D9.2 anti-IL-17BR antes del desafío con OVA. (d) Se reduce el número de linfocitos T gamma- delta en el bazo de ratones sensibilizados y desafiados con OVA en ratones KO IL-17BR y en ratones a los que se administra D9.2 antes del desafío con OVA. (e) El tratamiento con D9.2 reduce AHR en ratones sensibilizados y desafiados con OVA.

La Figura 9 muestra que D9.2 bloquea las respuestas IL-25 *in vivo* en un modelo de ratón de IBD. (a) El porcentaje de supervivencia de animales desafiados con oxazolona es más bajo que el de los controles que reciben solamente etanol. La administración de D9.2 antes de la sensibilización y el desafío reduce la tasa de mortalidad. (b) Se calculan las puntuaciones clínicas sobre la base de la pérdida de peso en combinación con el aspecto general y la conducta de cada animal. La administración de 9.2 tiene como resultado una mejora de la puntuación clínica en comparación con los ratones que reciben únicamente anticuerpo de isotopo. (c) Se reducen las longitudes del colon en ratones IBD en comparación con los controles. La administración de D9.2 protege contra dicha reducción en animales IBD.

Secuencias:

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención se describen en el presente documento además haciendo referencia a los siguientes números de identificación de secuencia:

- SEQ ID NO: 1 secuencia de nucleótidos que codifica VH D9.2
- SEQ ID NO: 2 secuencia de aminoácidos VH D9.2
- SEQ ID NO: 3 secuencia de nucleótidos que codifica VL D9.2
- SEQ ID NO: 4 secuencia de aminoácidos VL D9.2
- SEQ ID NO: 5 secuencia de aminoácidos CDR1 VH D9.2
- SEQ ID NO: 6 secuencia de aminoácidos CDR2 VH D9.2
- SEQ ID NO: 7 secuencia de aminoácidos CDR3 VH D9.2
- SEQ ID NO: 8 secuencia de aminoácidos CDR1 VL D9.2
- SEQ ID NO: 9 secuencia de aminoácidos CDR2 VL D9.2
- SEQ ID NO: 10 secuencia de aminoácidos CDR3 VL D9.2

En la lista de secuencias expuesta más adelante se indican otras secuencias.

Descripción detallada de la invención

La presente solicitud se refiere a reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

5 En general, la región variable de cadena pesada (dominio VH) de un anticuerpo desempeña un importante papel en la unión de un anticuerpo a un antígeno. Se ha observado que la región CDR3 de un dominio VH es más diversa que las regiones CDR1 y CDR2 y, por tanto, en la mayoría de los anticuerpos proporciona especificidad para la diana del anticuerpo. Así pues, las moléculas de anticuerpo de la invención se basan en torno a la región CDR3 de VH del anticuerpo D9.2. Las moléculas de anticuerpo de la invención comprenden las seis CDR del anticuerpo D9.2.

10 La estructura de una molécula de anticuerpo que comprende una CDR será generalmente de una secuencia de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo, o una sustancial porción de la misma, en la que la CDR está situada en una localización que corresponde a la CDR de dominios variables de anticuerpo VH y VL naturales codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y las localizaciones de los dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar haciendo referencia a Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª Edición. US Department of Health and Human Services. 1987, y las actualizaciones de la misma. Se dispone de una serie de recursos online académicos y comerciales para consultar esta base de datos. Por ejemplo, véase Martin, A.C.R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133 y el recurso online asociado, actualmente en la dirección web
20 <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

25 Generalmente, una molécula de anticuerpo comprende un dominio VH que está apareado con un dominio VL para proporcionar un dominio de unión de antígeno a anticuerpo, si bien en algunos casos, se puede utilizar un dominio VH en solitario para unir el antígeno. Por ejemplo, el dominio VH de D9.2 (SEQ ID NO: 2) puede aparearse con el dominio VL D9.2 (SEQ ID NO: 4), de manera que se forma un sitio de unión de antígeno a anticuerpo que comprende ambos dominios VH y VL de D9.2. Alternativamente, se puede aparear el dominio VH de D9.2 con un dominio VL distinto al dominio VL de D9.2.

30 La promiscuidad de la cadena ligera está perfectamente establecida en la técnica, tal como se explica a continuación en el presente documento.

Una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento se puede unir a IL-17BR humana y/o IL-17BR de ratón. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo se puede unir a IL-17BR humana y no presentar unión o sustancialmente ninguna unión con IL-17BR de ratón. Alternativamente, una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento se puede unir a IL-17BR de ratón y no presentar unión o sustancialmente ninguna unión con IL-17BR humana.

35 Preferentemente, las moléculas de anticuerpo presentan reacción cruzada con IL-17BR tanto humano como de ratón. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo reactiva en reacción cruzada se une tanto a IL-17BR humana como a IL-17BR de ratón.

40 Una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento se puede unir a IL-17BR con una afinidad que es sustancialmente similar a la de D9.2, p.ej. de 90 % a 110 % de la afinidad de unión de D9.2. Una molécula de anticuerpo será generalmente específica para IL-17BR. Es decir, una molécula de anticuerpo se puede unir a IL-17BR pero no presentará unión, o sustancialmente ninguna unión, con otros miembros de la familia IL-17R. Preferentemente, una molécula de anticuerpo específica para IL-17BR se une a IL-17BR pero no presenta unión o sustancialmente ninguna unión con IL-17RA, IL-17RC y/o IL-17RD.

50 Normalmente, la especificidad se puede determinar por medio de un ensayo de unión como ELISA empleando un panel de antígenos.

La unión de una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento con IL-17BR se puede eliminar por competencia con una IL-17BR recombinante.

55 Se pueden comparar la afinidad de unión y la potencia de neutralización de diferentes moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento en condiciones apropiadas aplicando técnicas de rutina.

60 Las moléculas de anticuerpo incluyen cualquier miembro o sustancia de unión que tenga un sitio de unión de antígeno a anticuerpo con la especificidad requerida y/o que se una a IL-17BR. Entre los ejemplos de moléculas de anticuerpo se incluyen isotipos de inmunoglobulina y sus subclases isotípicas; fragmentos de anticuerpo, tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb y Fd; moléculas de anticuerpo obtenidas por ingeniería genética, tales como Fab₂, Fab₃, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos; y cualquier otro polipéptido que comprenda un sitio de unión de antígeno a anticuerpo, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen las moléculas quiméricas, que comprenden un dominio de unión del antígeno o equivalente, fusionadas con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en las patentes europeas EP-A-0120694 y EP-A-0125023.

Entre los ejemplos de moléculas de anticuerpo se incluyen (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL o VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que están unidos un dominio VH y un dominio VL mediante un engarce de péptido que permite la asociación de los dos dominios para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS Estados Unidos, 85, 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (WO94/13804; P. Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 90 6444-6448, 1993). Fv, scFv o las moléculas de diacuerpo se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Y. Reiter et al, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). Se pueden fabricar también minicuerpos que comprenden un scFV unido a un dominio CH3. (S. Hu et al, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996). Las moléculas de anticuerpo y los métodos para su construcción y uso se describen en Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 (2005).

Cuando se utilicen moléculas de anticuerpo biespecíficas, pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales que se pueden fabricar de diversas formas (Holliger, P. and Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), p.ej. se pueden preparar químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden consistir en cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos que se han mencionado antes. Los diacuerpos y scFv se pueden construir sin una región Fc, utilizando solamente dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de una reacción anti-idiotípica.

Asimismo, los diacuerpos biespecíficos, en contraposición con los anticuerpos enteros biespecíficos, pueden ser particularmente útiles ya que se pueden construir fácilmente y expresar en *E. coli*. Se pueden seleccionar fácilmente los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas utilizando despliegue en fagos (documento WO94/13804) desde bibliotecas. Si se tiene que mantener constante un brazo del diacuerpo, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra IL-217BR, entonces se puede fabricar una biblioteca en la que el otro brazo se varía y se selecciona un anticuerpo de la especificidad apropiada. Se pueden fabricar anticuerpos enteros biespecíficos por ingeniería de botón en ojal (J. B. B. Ridgeway et al, Protein Eng., 9, 616-621, 1996).

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y aplicar técnicas de la tecnología de ADN recombinante para producir otras moléculas de anticuerpo o moléculas químicas que retengan la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo para las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EPA- 184187, GB 2188638A o EP-A-239400.

Preferentemente, se injertan las regiones CDR en una región marco humana. La región marco humana puede seleccionarse a través de diversos métodos, p.ej., comparando la región marco de ratón o las secuencias de la región V de ratón con la región marco humana o las secuencias de la región V conocidas u seleccionando la región marco humana que tenga mayor grado de similitud o identidad de aminoácidos, o uno de los más altos. Se pueden realizar modificaciones de regiones marco de secuencias humanas sin tratar previamente para optimizar aún más los anticuerpos con injerto de CDR resultantes.

Aunque las moléculas de anticuerpo que comprenden un par de dominios VH y VL son preferentes, se pueden utilizar también dominios de unión simples basados en secuencias de dominio o bien VH o bien VL. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina simples, especialmente los dominios VH, son capaces de unión de antígenos diana de una manera específica.

Ya sea uno u otro dominio de unión de cadena simple, dichos dominios se pueden utilizar para rastrear dominios complementarios capaces de formar una molécula de anticuerpo de doble dominio capaz de unir IL-17BR, tal como se describe en el presente documento más adelante.

Las moléculas de anticuerpo pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede unirse en su extremo terminado en C a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpo, incluyendo las cadenas C_κ o C_λ humanas, preferentemente cadenas C_λ. De manera similar, una molécula de anticuerpo basada en un dominio VH puede unirse en su extremo terminado en C a toda o parte de la cadena pesada de inmunoglobulina derivada cualquier isótopo de anticuerpo, p.ej., IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases del isotipo, en particular, IgG1 e IgG4. IgG4 es preferente. Se pueden emplear las regiones Fc como Δnab y Δnac que se describen en el documento WO99/58572.

Las regiones marco de las moléculas de anticuerpo de la invención también pueden incluir secuencias de glicosilación que incluyen uno o más sitios de glicosilación. Dependiendo de la célula huésped en la que se expresa el anticuerpo, el patrón de glicosilación puede variar. Así pues, las construcciones de ácido nucleico que codifican sitios de glicosilación pueden modificarse para eliminar el sitio o, alternativamente, se pueden introducir dichos sitios

en la proteína. Por ejemplo, los sitios de N-glicosilación en proteínas eucariotas se caracterizan por un triplete de aminoácido Asn-X-Y, en el que X es cualquier aminoácido excepto Pro, e Y es Ser o Thr. Las sustituciones, adiciones o deleciones apropiadas de la secuencia de nucleótidos que codifican estos tripletes tendrán como resultado evitar que se unan restos de carbohidrato en la cadena lateral Asn. La alteración de un solo nucleótido, seleccionado para que Asn esté reemplazado por un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente para inactivar un sitio de N-glicosilación. Los procedimientos conocidos para inactivar sitios de N-glicosilación en proteínas incluyen los descritos en la patente estadounidense. No. 5.071.972 y la patente europea EP 276.846.

La expresión "dominio de unión a antígeno" describe la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente a un antígeno y es complementaria de parte o todo el antígeno. Cuando el antígeno es grande, es posible que el anticuerpo se una solamente a una parte concreta del antígeno, parte que se denomina epítipo. El dominio de unión a antígeno se puede proporcionar a través de uno o más dominios variables de anticuerpo (p.ej., el llamado fragmento de anticuerpo Fd que consiste en un dominio VH). Preferentemente, un dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL), o al menos una sustancial porción del mismo, y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH), o al menos una sustancial porción del mismo.

Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos tres regiones CDR, junto con sus regiones marco intermedias. Preferentemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente 50 % de una o ambas regiones marco primera y cuarta, siendo dicho 50 % el 50 % de la primera región marco C-terminal y el 50 % de la cuarta región marco N-terminal. Los restos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de una parte sustancial del dominio variable pueden ser los que no están asociados normalmente con las regiones del dominio variable natural. Por ejemplo, la construcción de moléculas de anticuerpo fabricadas a través de técnicas de ADN recombinante puede tener como resultado la introducción de restos N- o C-terminales codificados por engarces introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de engarces para unir dominios variables a otras secuencias de proteína incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteínas tal como se explica con mayor detalle más adelante.

Por lo general, se aislarán las moléculas de anticuerpo y los ácidos nucleicos que codifican moléculas de anticuerpo, es decir, se las dejará desprovistas o sustancialmente desprovistas del material con el que están asociadas de forma natural, como pueda ser otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural o el entorno en el que se preparan (p.ej., cultivo celular), cuando dicha preparación se realiza mediante tecnología de ADN recombinante *in vitro* o *in vivo*.

Las moléculas de anticuerpo y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y, aun así, por motivos prácticos, aislarse; por ejemplo las moléculas estarán mezcladas por lo general con gelatina u otros vehículos si se utilizan para revestir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, cuando se utilicen en diagnóstico o terapia. Las moléculas de anticuerpo se pueden glicosilar, ya sea de forma natural o a través de sistemas de células eucariotas heterólogas (p.ej., células CHO o NS0 (ECACC 85110503)), o pueden estar sin glicosilar (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procarionota).

Además de las secuencias de anticuerpo, una molécula de anticuerpo, tal como se describe en el presente documento, puede comprender otros aminoácidos, p.ej., formando un péptido o polipéptido, como pueda ser un dominio plegado, o para impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse a antígeno.

En algunas realizaciones, las moléculas de anticuerpo pueden llevar un marcador detectable o funcional o se pueden conjugar con una toxina o enzima (p.ej., una unión peptídica o un engarce).

Un marcador puede ser una molécula que produce o que puede inducir a producir una señal, incluyendo pero sin limitarse sólo a ellas, agentes de fluorescencia, radiomarcadores, enzimas, quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. De esta manera, se puede detectar y/o medir la unión detectando la fluorescencia o luminiscencia, radioactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz.

Entre los marcadores adecuados se incluyen radiomarcadores tales como I^{131} o Tc^{99} , que se pueden unir a moléculas de anticuerpo utilizando tratamientos químicos convencionales conocidos en la técnica de la obtención de imágenes de anticuerpos. Los marcadores también incluyen marcadores enzimáticos, tales como peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato dehidrogenasa ("G6PDH"), alfa-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica y acetilcolinesterasa. Los marcadores incluyen marcadores fluorescentes o agentes fluorescentes, tales como fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, compuestos de rodamina y derivados y PFV (las siglas PFV se refieren a "proteína fluorescente verde"). Los marcadores pueden incluir además fracciones químicas como biotina, que se puede detectar a través de la unión a una fracción detectable de cognado específico, p.ej., avidina marcada.

Cuando la característica adicional es un dominio de polipéptido o marcador, la molécula de anticuerpo puede producirse a través de técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de ácido nucleico que codifica una fusión de la molécula de anticuerpo y el dominio adicional.

5 Las moléculas de anticuerpo reactivas con IL-17BR pueden comprender variantes de los dominios VH y VL y la CDR descritas en el presente documento. Las variantes se pueden obtener por medio de métodos de alteración o mutación de secuencias y cribado.

10 La molécula de anticuerpo puede ser aquella que compite por la unión con IL-17BR con cualquier molécula de anticuerpo que se une a IL-17BR y comprende un dominio VH y/o –VL tal como se describe en el presente documento, más preferentemente, una molécula de anticuerpo que comprende el dominio VH de SEQ ID NO: 2 y el dominio VL de SEQ ID NO: 4. Por tanto, un aspecto más de la presente divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que comprende un sitio de unión de antígeno a anticuerpo humano que compite con D9.2 por la unión con IL-17-bR. La competición entre las moléculas de anticuerpo se puede determinar fácilmente por ensayo *in vitro*,
15 por ejemplo, empleando ELISA y/o por marcado de una molécula informadora específica para una molécula de anticuerpo que se puede detectar en presencia de otra(s) molécula(s) de anticuerpo sin marcar, para dar cabida a la identificación de molécula(s) de anticuerpo que se unen al mismo epítipo o un epítipo superpuesto.

20 Se dispone de diversos métodos en la técnica para la obtención de moléculas de anticuerpo contra IL-17-BR y que pueden competir con D9.2 por la unión con IL-17BR.

25 Se pueden emplear variantes de las secuencias de dominio variable de los aminoácidos descritos en el presente documento, tal como se ha explicado. Las variantes en particular pueden incluir una o más alteraciones de las secuencias de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un resto aminoácido), pueden consistir en menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2 o 1. Las alteraciones se pueden introducir en una o más regiones marco y/o una o más CDR.

30 Se puede transportar una secuencia de aminoácidos CDR sustancialmente tal como se expone en el presente documento como una CDR en un dominio variable humano o una porción sustancial del mismo. Por ejemplo, se pueden transportar secuencias CDR3 de VH sustancialmente tal como se expone en el presente documento como una CDR3 de VH en un dominio variable de cadena pesada humano o una porción sustancial del mismo.

35 Otro aspecto de la divulgación proporciona una molécula de anticuerpo que se une a IL-17-BR y que comprende un dominio VH de anticuerpo que comprende CDR3 de VH sustancialmente tal como se exponen en SEQ ID NO: 7.

La molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de VH sustancialmente, tal como se expone en las SEQ ID NOS: 5, 6 y 7, respectivamente.

40 Un dominio VH se puede aparear con un dominio VL, por ejemplo, un dominio VL con CDR1, CDR2 y CDR3, sustancialmente tal como se expone en SEQ ID NOS: 8, 9 y 10, respectivamente.

45 En algunos casos, una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de VH sustancialmente tal como se expone en las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente; y un dominio VL con una CDR1, CDR2 y CDR3 sustancialmente tal como se expone en las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente.

Los dominios VH y VL pueden tener regiones marco humanas o no humanas, como por ejemplo regiones marco sustancialmente tal como se expone en las regiones marco de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

50 En algunos casos, la molécula de anticuerpo puede comprender las secuencias de dominio VH y VL sustancialmente tal como se expone en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

55 Ha de entenderse por “sustancialmente tal como se expone” que la CDR o dominio VH o VL correspondiente será idéntica o muy similar a las regiones especificadas cuya secuencia se expone en el presente documento. Se contempla como “muy similar” la posibilidad de realizar de 1 a 5, preferentemente de 1 a 4, como por ejemplo de 1 a 3 o 1 o 2, o 3 o 4 sustituciones de aminoácido en la CDR y/o dominio VH o VL.

60 Se pueden generar variantes de moléculas de anticuerpo llevando a cabo una mutagénesis aleatoria de uno o ambos genes VH y/o VL de D9.2 para generar mutaciones dentro de todo el dominio variable. Gram et al (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., Estados Unidos, 89:3576-3580) describe dicha técnica empleando PCR propensa a error.

Otro método que se puede aplicar consiste en dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes VH o VL. Dichas técnicas están descritas por Barbas et al, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., Estados Unidos, 91:3809-3813) y Schier et al (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567).

65

Todas las técnicas que se han descrito son conocidas como tales dentro de la especialidad y por si mismas no forman parte de la presente invención. Las personas especializadas en la técnica podrán aplicar dichas técnicas para proporcionar las moléculas de anticuerpo tal como se describen en el presente documento aplicando la metodología habitual en la especialidad.

5 Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para obtener una molécula de anticuerpo contra IL-17BR que comprende:

10 proporcionar un ácido nucleico de partida que codifica una molécula de anticuerpo que tiene una o más (es decir, una, dos, tres, cuatro, cinco o las seis) de las secuencias CDR de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4; modificar dicho ácido nucleico para alterar la secuencia o secuencias CDR; expresar dicha molécula de anticuerpo modificada; y someter a ensayo dicha molécula de anticuerpo modificada para determinar su unión contra IL-17BR.

15 Preferentemente, la modificación se llevará a cabo en una pluralidad de moléculas de ácido nucleico de partida para proporcionar un repertorio de secuencias modificadas que tienen diversidad de afinidades de unión.

El ácido nucleico de partida comprende preferentemente las tres CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 2, ya sea en la propia forma SEQ ID NO: 2 o transportada en otra secuencia marco.

20 Las modificaciones pueden dirigirse a una sola CDR, p.ej., la CDR3, o se pueden dirigir modificaciones a dos o más regiones CDR simultáneamente.

25 Los dominios variables pueden obtenerse de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado o pueden consistir en un dominio variable sintético basado en secuencias de consenso de dominios variables humanos conocidos. La secuencia CDR tal como se describe en el presente documento (p.ej., CDR3) se puede introducir en un repertorio de dominios variables que carece de CDR (en particular CDR3) aplicando tecnología de ADN recombinante.

30 Por ejemplo, Marks et al (Bio/Technology, 1992, 10:779-783) describe métodos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que se utilizan cebadores de consenso dirigidos o adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable en conjunción con cebadores de consenso para la tercera región marco de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks *et al* describe además cómo este repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo en particular. Con técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 se pueden barajar con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3 y combinarse los dominios VH o VL completos barajados con un dominio VL o VH cognado para proporcionar moléculas de anticuerpo tal como se describen en el presente documento. El repertorio se puede desplegar a continuación en un sistema huésped adecuado, como pueda ser el sistema de despliegue en fagos del documento WO92/01047 de manera que se puedan seleccionar moléculas de anticuerpo adecuadas. Un repertorio puede consistir en desde 10^4 miembros individuales en adelante, como por ejemplo de 10^6 a 10^8 o 10^{10} miembros.

45 Stemmer (Nature, 1994, 370:389-391) divulga técnicas de barajado o combinatorias análogas, describiendo la técnica en relación con un gen β -lactamasa, si bien observa que el enfoque se puede aplicar a la generación de anticuerpos.

Un aspecto más de la divulgación proporciona por tanto un método para preparar una molécula de anticuerpo específica para IL-17BR, método que comprende:

- 50 (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH que o bien incluye una CDR3 para ser reemplazada o bien carece de una región que codifica CDR3;
- (b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donador que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente tal como se expone en SEQ ID NO: 7 de manera que se inserta el ácido nucleico donador en la región CDR3 del repertorio para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;
- 55 (c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos;
- (d) seleccionar una molécula de anticuerpo específica para IL-17BR; y
- (e) recuperar dicha molécula de anticuerpo o dicho ácido nucleico que la codifica.

60 El repertorio de productos se puede co-exresar, desde el mismo vector o desde un vector diferente, con un dominio VL. El dominio VL puede ser el dominio VL descrito en el presente documento, p.ej. el dominio VL de SEQ ID NO: 4, o puede ser uno o más dominios VL diferentes, tal como se describe más adelante en relación con el barajado de cadena.

65 Se puede emplear un método análogo en el que se combina CDR3 de VL sustancialmente tal como se expone en SEQ ID NO: 10 con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican un dominio VL que o bien incluye una CDR3 para ser reemplazada o bien carece de región que codifica CDR3. Al igual que con el método antes descrito, el

repertorio de productos VL puede co-expresarse, desde el mismo vector o desde un vector diferente, con un dominio VH. El dominio VH puede ser el dominio VH descrito en el presente documento, es decir el dominio VH de SEQ ID NO: 2 o puede ser uno o más dominios VH diferentes, tal como se describe más adelante en relación con el barajado de cadena.

5 De manera similar, se pueden injertar una o más, o las tres CDR en un repertorio de dominios VH o VL que se rastrean a continuación en busca de moléculas de anticuerpo o moléculas de anticuerpo específicas para IL-17BR.

10 Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para obtener un dominio de unión de antígeno a anticuerpo para IL-17BR, comprendiendo dicho método combinar un dominio VH de una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento (incluyendo variantes como las que se han explicado antes) con uno o más dominios VL, y someter a ensayo la combinación o combinaciones de VH/VL para determinar el dominio de unión de antígeno a anticuerpo para IL-17BR.

15 Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como la expuesta en el presente documento. Por ejemplo, el dominio VL puede ser sustancialmente tal como se expone en SEQ ID NO: 4.

20 Se puede emplear un método análogo en el que se combinan una o más variantes de secuencia de un dominio VL descrito en el presente documento con uno o más dominios VH.

25 Esto se puede conseguir a través de métodos de cribado de despliegue en fagos aplicando el llamado enfoque combinatorio dual jerárquico descrito en el documento WO92/01047 en el que se utiliza una colonia individual que contiene un clon de cadena H o L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y se selecciona la molécula de anticuerpo bicatenaria resultante con arreglo a técnicas de despliegue en fagos como las que se describen en dicho trabajo de referencia.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un método para la selección de una molécula de anticuerpo para IL-17BR, método que comprende

- 30 (a) proporcionar un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR3 de VH con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 7;
- (b) combinar dicho dominio VH con una pluralidad de dominios VL de anticuerpo para proporcionar moléculas de anticuerpo;
- 35 (c) rastrear dichas moléculas de anticuerpo para determinar la unión a IL-17BR; y
- (d) seleccionar una molécula de anticuerpo que se une a IL-17BR.

En dicho método, se puede proporcionar los dominios VH y VL en forma de proteínas expresadas por ADN recombinante, en particular por ADN de fago o fagémido.

40 La pluralidad de los dominios VL puede ser cualquier a partir de 10^4 dominios individuales en adelante, por ejemplo de 10^6 a 10^8 o 10^{10} dominios.

45 IL-17BR, conocida en la técnica también como IL-25R, IL-17RB o IL-17RH1, está disponible en el mercado (p.ej. R&D Systems, MN, Estados Unidos) como proteína de fusión Fc, o se puede clonar o sintetizar haciendo referencia a secuencias de IL-17BR disponible en la técnica.

50 IL-17BR murina (GeneID: Ácido nucleico: NM_019583.3 GI: 142368701; NP_062529.2 GI: 83025064) está descrita por Tian et al., 2000 (Ref. 11 más adelante). IL-17BR humana (GeneID: 55540, Ácido nucleico: NM_018725.3 GI:112382255; Proteína NP_061195.2 GI:27477074) está descrita por Shi, Y., et al., 2000 (Ref. 10 más adelante).

Para la producción de anticuerpos o su uso en inmunoensayos se pueden utilizar fragmentos de IL-17BR recombinante, en particular los que contienen el dominio extracelular.

55 En otros aspectos, la divulgación proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo, un dominio VH o un dominio VL tal como se ha descrito, por ejemplo, un dominio VH o VL de SEQ ID NO: 2 y 4 respectivamente, así como métodos de preparación de una molécula de anticuerpo, un dominio VH o un dominio VL tal como se ha descrito, que comprende la expresión de dicho ácido nucleico en condiciones idóneas para dar lugar a la producción de dicha molécula de anticuerpo, dominio VH o dominio VL y su recuperación.

60 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica una secuencia de CDR de VH o CDR de VL divulgada en el presente documento, especialmente una CDR de VH seleccionada de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, una CDR de VL seleccionada de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, siendo lo más preferente CDR VH de D9.2 (SEQ ID NO. 7).

65

Los ácidos nucleicos pueden comprender las secuencias o las porciones pertinentes de las mismas (p.ej., regiones que codifican CDR) de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o variantes de estas secuencias modificadas, por ejemplo, por mutagénesis dirigida a sitio para codificar otros dominios VH y VL. Sin embargo, el uso de codón puede variar, p.ej., para optimizar la expresión de la secuencia en una célula huésped deseada.

5 Otro aspecto de la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de anticuerpo de la presente invención. El ácido nucleico incluye ADN y ARN. En un aspecto preferente, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica las CDR de los dominios VH y VL de un anticuerpo de la invención, tal como se expone en las reivindicaciones.

10 El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos, tal como se muestra en el presente documento, abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U está sustituido por T, a no ser que el contexto lo requiera de otra forma.

15 Otros aspectos de la presente invención proporcionan también vectores como, por ejemplo, en forma de un plásmido, virus, p.ej., fago o fagémido, cósmidos, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un ácido nucleico como los descritos.

20 Los vectores adecuados se pueden seleccionar o construir, con un contenido de secuencias reguladoras apropiado, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Para mayor detalle, véase por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª Edición*, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

25 Los vectores también incluyen vectores virales capaces de infectar células humanas *in vivo*, p.ej., vectores de virus, adenovirales, retrovirales o adenoasociados. Dichos vectores pueden ser útiles para la expresión de una molécula de anticuerpo de la invención en las células de un sujeto humano o animal, para proporcionar la producción y entrega de la molécula de anticuerpo a dicho sujeto.

30 Una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo de la invención estará, en uno de los aspectos, unida operativamente a un promotor para llevar a efecto la expresión de la molécula de anticuerpo en una célula huésped. La secuencia puede incluir en su extremo 5' una secuencia líder para facilitar la expresión y/o secreción de la molécula de anticuerpo en la célula huésped y/o desde ella. Se conocen numerosas secuencias líder adecuadas como tales en la técnica, que podrán ser seleccionadas por la persona especializada en la técnica teniendo en cuenta la célula huésped.

35 En *Current Protocols in Molecular Biology*, 2ª Edición, Ausubel et al., eds. John Wiley & Sons, 1992, se describen con detalle muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas.

Otro aspecto proporciona una célula huésped transformada con un ácido nucleico (p.ej., una secuencia de ácidos nucleicos en forma de vector) de la invención.

45 El ácido nucleico puede estar integrado en el genoma (p.ej., cromosoma) de la célula huésped. La integración se puede promover por inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma con arreglo a técnicas convencionales.

50 Otro aspecto proporciona un método de producción de una molécula de anticuerpo tal como se describe en el presente documento, incluyendo dicho método causar la expresión desde el ácido nucleico de codificación. Dicho método puede comprender el cultivo de células huésped en condiciones adecuadas para la producción de dicha molécula de anticuerpo.

55 Tras la producción por expresión, se puede aislar y/o purificar un dominio VH o VL o una molécula de anticuerpo aplicando cualquier técnica adecuada y utilizarlo después según sea apropiado. Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto.

60 Tras la purificación del producto, se puede modificar la molécula de anticuerpo por medios físicos o químicos, por ejemplo para introducir grupos protectores que alteren, p.ej., que aumenten, la estabilidad o semivida biológica de la proteína. Por ejemplo, dentro de la técnica se conoce como tal la PEGilación de proteínas para conseguir dichos efectos y las moléculas de anticuerpo de la invención se pueden presentar en forma PEGilada.

Un método de producción puede comprender la formulación del producto en una composición que incluya al menos un componente adicional, como pueda ser un excipiente farmacéuticamente aceptable.

65

La presente divulgación proporciona asimismo una célula huésped recombinante que comprende uno o más ácidos nucleicos o vectores, tal como se ha descrito.

Los sistemas para la clonación y expresión de una molécula de anticuerpo en diversas células huéspedes diferentes son conocidos. Entre las células huésped adecuadas se incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero de las que dispone la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/O y muchas otras. Un huésped bacteriano preferente es *E. coli*.

La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas como *E. coli* está perfectamente establecida en la técnica. Para una revisión, véase por ejemplo Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión de células eucariotas en cultivo también está disponible para las personas especializadas en la técnica como opción para la producción de una molécula de anticuerpo, véase las revisiones recientes, como por ejemplo Ref, M.E. (1993) *Curr. Opinión Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. et al. (1995) *Curr. Opinión Biotech* 6: 553-560.

Los datos que se exponen en el presente documento demuestran por primera vez que los anticuerpos contra IL-17BR son eficaces para prevenir o reducir la hiperrespuesta de las vías respiratorias *in vivo*, síntoma clave del asma.

La invención proporciona además una molécula de anticuerpo de la invención para su uso en un método de tratamiento, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para prevenir o reducir la hiperrespuesta de las vías respiratorias en un sujeto (p.ej., un ser humano) que lo necesita, que comprende la administración a dicho sujeto de una molécula de anticuerpo que se une a IL-17BR, por ejemplo, una molécula de anticuerpo que se ha descrito. Otro aspecto de la divulgación proporciona un método de prevención, reducción o tratamiento de asma, u otra afección mediada por IL-25 en un sujeto que lo necesita, que comprende la administración al sujeto de una molécula de anticuerpo que se une a IL-17BR. Otras afecciones medidas por IL-25 incluyen alergia y colitis, que incluye a su vez colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. El asma incluye asma alérgica.

Por consiguiente, otro aspecto de la divulgación proporciona un método para prevenir o reducir la inflamación del colon en un sujeto (p.ej., un ser humano) que lo necesita, que comprende la administración a dicho sujeto de una molécula de anticuerpo que se une a IL-17BR, por ejemplo la molécula de anticuerpo que se ha descrito. Otro aspecto de la divulgación proporciona un método para prevenir, reducir o tratar IBD, que comprende la administración al sujeto de una molécula de anticuerpo que se une a IL-17BR. Las afecciones medidas por IL-25 incluyen colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Otras afecciones medidas por IL-25 incluyen colitis (inflamación del colon), incluyendo colitis crónica.

Los métodos terapéuticos se pueden poner en práctica con moléculas de anticuerpo (incluyendo composiciones de las mismas), tal como se ha descrito, que son útiles en la unión a IL-17BR y que antagonizan los efectos de la unión de IL-17BR/IL-25, con potencial terapéutico para varias enfermedades y trastornos en los que IL-17BR desempeña un papel. Asimismo, se pueden poner en práctica los métodos con otras moléculas de anticuerpo (incluyendo composiciones de las mismas) que se unen a IL-17BR y que antagonizan los efectos de la unión de IL-17Br-IL-25, que se pueden obtener tal como se describe más adelante, en los ejemplos adjuntos.

Las moléculas de anticuerpo (incluyendo composiciones de las mismas) que se han descrito se pueden utilizar en un método de tratamiento (incluyendo un tratamiento profiláctico) o diagnóstico en un sujeto humano o animal. Dicho método de tratamiento o diagnóstico (que puede incluir un tratamiento profiláctico) puede comprender la administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo de la invención. A continuación, se exponen ejemplos de dichas enfermedades y trastornos.

Se describe asimismo el uso de una molécula de anticuerpo (incluyendo una composición de la misma) tal como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para su administración a un sujeto humano o animal.

Las indicaciones clínicas en las que se puede utilizar la molécula de anticuerpo anti-IL-17BR para proporcionar un beneficio terapéutico incluyen cualquier afección en la que la unión de IL-17BR/IL-25 tiene consecuencias patológicas. Por lo tanto, en general, la molécula de anticuerpo descrita en el presente documento se puede utilizar en el tratamiento de cualquier afección medida por IL-25, como por ejemplo la asociada con una respuesta de Th2 o respuesta de tipo -2 no deseada. En algunos casos, la molécula de anticuerpo de la invención se puede utilizar para el tratamiento de alergia y asma, en particular asma. En algunos casos, la molécula de anticuerpo de la invención se puede utilizar para el tratamiento de IBD, en particular, para el tratamiento de UC y/o CD.

El tratamiento anti-IL-17BR se puede administrar por inyección (p.ej., por vía intravenosa) o a través de métodos de administración local. Anti-IL-17BR se puede suministrar a través de tecnologías génicas. Las estrategias de formulación alternativas pueden proporcionar preparaciones adecuadas para ruta oral o supositorios. La ruta de

administración se puede determinar basándose en las características psicoquímicas del tratamiento, según consideraciones concretas dependiendo de la enfermedad, para optimizar la eficacia y reducir al mínimo los efectos secundarios.

5 Las composiciones proporcionadas se pueden administrar a individuos. La administración se realiza preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", es decir la suficiente para producir un beneficio al paciente. Dicho beneficio puede consistir en al menos una mejora de al menos un síntoma. La cantidad administrada real, la pauta y el periodo de administración dependerán del carácter y gravedad de la patología que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, p.ej., las decisiones en cuanto a la posología, etc., entra dentro del criterio del facultativo o el médico responsable. Las dosis apropiadas de anticuerpo son conocidas dentro de la especialidad; véase Ledermann J.A. et al. (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922.

15 La dosis exacta dependerá de una serie de factores, incluyendo si el anticuerpo es para el diagnóstico o para el tratamiento, el tamaño y la localización del área que se vaya a tratar, la naturaleza exacta del anticuerpo (p.ej., un anticuerpo completo, un fragmento o un diacuerpo) y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo normal se encontrará dentro del intervalo de 0,5 mg – 1,0 g, que se pueden administrar por vía intravenosa, como un bolo o como una infusión, a lo largo de varias horas, según sea apropiado para conseguir la dosis requerida. Otros modos de administración incluyen infusión intravenosa a lo largo de varias horas para conseguir una dosis acumulativa total similar. Esto se refiere a una dosis para un único tratamiento de un paciente adulto, que se podrá ajustar proporcionalmente para niños y lactantes y ajustarse también para otros formatos de anticuerpo en proporción con el peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir de forma diaria, dos veces a la semana, semanalmente o a intervalos mensuales, a discreción del médico.

25 En otro modo de administración se emplea un revestimiento previo o se incorpora de otra forma en dispositivos fijos para los cuales, se determinará la cantidad de anticuerpo óptima por experimentación apropiadamente.

30 En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo puede ser un fragmento monomérico como F(ab) o scFv. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden tener la ventaja de una semi-vida relativamente corta y un menor riesgo de activación de plaquetas, que puede derivarse de la agregación en el receptor. La agregación que da lugar a la activación plaquetaria podría ser de moléculas IL-17BR o de IL-17BR con moléculas FcγRII por ejemplo.

35 Si se utiliza un anticuerpo completo, preferentemente está en una forma que no pueda activar y/o destruir plaquetas. El isotipo IgG4 o, alternativamente, los isotipos "diseñadores" derivados de la estructura de IgG1 (construcciones de gen Fc nuevas, documento WO99/58572, Clark, Armour, Williamson) son opciones preferentes. Se pueden utilizar fragmentos de anticuerpo más pequeños como F(ab')₂. Por otra parte, se pueden utilizar anticuerpos enteros o fragmentos (p.ej., F(ab')₂ o diacuerpos) con especificidad de epítipo dual (p.ej. para los epítopos reconocidos por D9.2 scFv). Aunque dicha realización puede promover la agregación en el receptor, una alta velocidad de asociación para receptores individuales puede descartar este problema.

40 Las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento se administrarán normalmente en forma de una composición farmacéutica que puede comprender al menos un componente además de la molécula de anticuerpo.

45 Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, así como para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otro material farmacéuticamente aceptable conocido entre las personas especializadas en la técnica. Dichos materiales no deberán ser tóxicos y no deberán interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza exacta del vehículo u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral o por inyección, p.ej., intravenosa.

50 Las formulaciones terapéuticas de la molécula de anticuerpo se pueden preparar para su almacenamiento mezclando la molécula de anticuerpo con el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (véase, p.ej., "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª Edición, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.), en forma de polvo liofilizado o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes y estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las posologías y concentraciones empleadas e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinil pirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones de formación de sal como sodio; y/o tensioactivos no iónicos como Tween, Pluronic o polietileno glicol (PEG).

65 La molécula de anticuerpo que se utilice para su administración *in vivo* deberá ser estéril. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución. La molécula de anticuerpo se almacenará por lo general en forma liofilizada o en solución.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden presentarse como comprimidos, cápsulas, polvos o en forma líquida. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido, como gelatina, o un adyuvante. Las composiciones líquidas farmacéuticas comprenden generalmente un vehículo líquido como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otras soluciones de sacárido o glicoles como etilen glicol, propilen glicol o polietilen glicol.

Para inyección intravenosa, o para inyección en el sitio afligido, se puede presentar el principio activo en forma de solución acuosa parenteralmente aceptable, desprovista de pirógenos y con pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Las personas especializadas en la técnica correspondiente podrán preparar soluciones adecuadas utilizando por ejemplo vehículos isotónicos como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir también, según sea necesario, conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos.

Una molécula de anticuerpo de la invención se puede administrar en solitario o combinada con otros tratamientos, ya sea de forma simultánea o secuencialmente, dependiendo de la afección que se vaya a tratar. Otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos para aliviar el dolor, tales como fármacos no esteroides antiinflamatorios (p.ej., aspirina, paracetamol, ibuprofeno o cetoprofeno) u opiáceos como morfina; la administración de antieméticos; o la administración de al menos otro compuesto activo contra el asma, generalmente un agente broncodilatador que produce relajación de las vías respiratorias o que potencia la eliminación de moco, p.ej., un beta-agonista (p.ej., salbutamol, salmeterol), cromoglicato disódico, esteroides o un inhibidor de PDE_{IV}.

Otro aspecto de la divulgación proporciona un método que comprende causar o permitir la unión de una molécula de anticuerpo tal como se proporciona en el presente documento con IL-17Br. Tal como se ha señalado, dicha unión puede tener lugar *in vivo*, p.ej., tras la administración de una molécula de anticuerpo, o ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en ELISA, transferencia de Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación o cromatografía de afinidad.

La cantidad de unión de molécula de anticuerpo a IL-17BR puede determinarse. La cuantificación puede estar relacionada con la cantidad del antígeno en una muestra de ensayo que puede ser de interés diagnóstico.

Se pueden determinar las reactividades de las moléculas de anticuerpo en una muestra a través de medios apropiados. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. Se mezcla un antígeno marcado radioactivo con un antígeno sin marcar (muestra de ensayo) y se permite que se una a la molécula de anticuerpo. Se separa físicamente el antígeno unido del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radioactivo unida al anticuerpo. Cuanto más antígeno haya en la muestra de ensayo, menos antígeno radioactivo se unirá a la molécula de anticuerpo. Se puede utilizar también un ensayo de unión competitiva con un antígeno no radioactivo utilizando un antígeno o un análogo unido a una molécula informadora. La molécula informadora puede ser un fluorocromo, fósforo o láser de colorante, con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y rojo de Texas. Entre los colorantes cromógenos adecuados se incluyen diaminobencidina.

Otros informadores incluyen partículas o material en partículas coloidales macromoleculares, como perlas de látex coloreadas, magnéticas o paramagnéticas y agentes biológica o químicamente activos que pueden causar directa o indirectamente señales detectables para ser observadas visualmente, detectadas electrónicamente o registradas de otro modo. Dichas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que revelan o cambian los colores o causan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Se pueden excitar molecularmente, de manera que las transiciones electrónicas entre estados de energía tienen como resultado absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas utilizadas en combinación con biosensores. Se pueden emplear los sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Las señales generadas por conjugados individuales anticuerpo-informador se pueden utilizar para producir datos relativos o absolutos cuantificables de la correspondiente unión de anticuerpo en las muestras (normal y de ensayo).

La presente divulgación proporciona también el uso de una molécula de anticuerpo como la descrita para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competencia, es decir, un método para medir el nivel de antígeno en una muestra empleando una molécula de anticuerpo tal como se proporciona en el presente documento en un ensayo de competencia. Esto es posible en los casos en los que no se requiere la separación física de antígeno unido o sin unir. Una posibilidad es la unión de una molécula informadora a la molécula de anticuerpo para que tenga lugar un cambio físico u óptico. La molécula informadora puede generar señales directa o indirectamente, preferentemente medibles. La unión de las moléculas informadoras puede ser directa o indirecta, covalente, p.ej., una unión peptídica, o no covalente. La unión a través de un enlace péptido puede ser como resultado de una expresión recombinante de una fusión del gen que codifica anticuerpo y molécula informadora.

La presente divulgación proporciona también la medición de los niveles de antígeno directamente empleando una molécula de anticuerpo tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, en un sistema de biosensor.

El modo de determinación de la unión no es una característica de la presente divulgación y las personas especializadas en la técnica podrán elegir un modo adecuado según sus preferencias y su conocimiento general.

5 La presente divulgación se extiende además a una molécula de anticuerpo que compite por la unión con IL-17BR con cualquier molécula de anticuerpo que se une al antígeno y que comprende un dominio VH y/o VL incluyendo una CDR con aminoácido sustancialmente tal como se expone en el presente documento o un dominio VH y/o VL con una secuencia de aminoácidos sustancialmente, tal como se expone en el presente documento. La competencia entre las moléculas de anticuerpo se puede determinar por ensayo *in vitro* fácilmente, por ejemplo, por marcado de una molécula informadora específica para una molécula de anticuerpo que se puede detectar en presencia de otra(s) molécula(s) de anticuerpo no marcada(s), para permitir la identificación de moléculas de anticuerpo que se unen al mismo epítipo o un epítipo de superposición. La competencia puede determinarse por ejemplo por ELISA o citometría de flujo.

15 Se puede recurrir a una reacción de competencia para seleccionar una o más moléculas de anticuerpo, tales como derivados de D9.2, que puedan tener una o más propiedades adicionales o mejoradas. Esto es análogo al método de selección para D.9.2 con la excepción de que no se eluye IL-17BR desde su mini-ligando, sino de una molécula de anticuerpo. Esto puede ser importante, ya que debería producir una mayor proporción de moléculas de anticuerpo hijas que compiten directamente con la parental. De hecho, dichas moléculas de anticuerpo hijas, tal como se seleccionan, pueden tener una mayor afinidad para el antígeno que la parental (lo que da cabida a una potenciación de la avidéz que puede derivarse del despliegue de más de una molécula de anticuerpo por fago). Los métodos actuales para seleccionar las moléculas de anticuerpo en fagos "hijas" de mejor afinidad incluyen:

25 uso de concentraciones de antígeno diana (marcado) menores que la constante de disociación del anticuerpo parental original;
 uso de un exceso de antígeno diana sin marcar como competidor tal como se demuestra en Hawkins *et al.* (1992). Si bien no especifican necesariamente que el anticuerpo "mejorado" deba desplazar/ocupar el mismo epítipo que el parental.
 La incorporación de la etapa de elución deberá producir una mayor proporción de moléculas de anticuerpo hijas que no desplazan la parental. Las moléculas de anticuerpo hijas seleccionadas de esta forma pueden unirse a un epítipo muy similar con la molécula de anticuerpo parental, pero con una mayor afinidad.

35 Al someter a ensayo la competencia, se puede emplear un fragmento peptídico de IL-17BR, especialmente un péptido que incluya un epítipo de interés. Se puede usar un péptido que tenga la secuencia del epítipo más uno o más aminoácidos en cada extremo. Se puede decir que dicho péptido "consiste esencialmente" en la secuencia especificada. Las moléculas de anticuerpo pueden ser moléculas de anticuerpo para que se inhiba su unión con IL-17BR mediante un péptido con la secuencia dada o que la incluya. En el ensayo para determinarlo, se puede utilizar un péptido con cualquiera de las secuencias más uno o más aminoácidos.

40 Las moléculas de anticuerpo que se unen a un péptido específico se pueden aislar por ejemplo desde una biblioteca de despliegue en fagos por selección con el (los) péptido(s).

45 "y/o", cuando se utilizan en el presente documento, ha de entenderse como la descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" ha de entenderse como una descripción específica de cada uno de los siguientes: (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si se mencionaran individualmente en el presente documento.

50 A no ser que venga dictado por el contexto de otra forma, las descripciones y las definiciones de las características que se han expuesto no están limitadas a ningún aspecto o realización en particular de la invención y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

A continuación, se ilustran ciertos aspectos y realizaciones de la invención mediante ejemplos y haciendo referencia a las figuras antes descritas.

55 Ejemplos

Métodos y materiales

Cribado de sobrenadantes por ELISA

60 Se revistieron inmunoplaquetas de 96 pocillos (Nunc) con 50 µl/pocillo de IL-17Br-Proteína de fusión Fc murina o humana a 1 µg/ml en 0,1 M NaHCO₃ durante toda la noche a 4 °C o durante 3 horas, a temperatura ambiente. Al día siguiente, se lavaron los pocillos 5 veces con PBS, 0,05% tween y después se bloquearon en PBS 10 % FCS durante 4 horas a temperatura ambiente. Durante el mismo período de 4 horas, se incubaron los sobrenadantes desde el cultivo de células del hibridoma con 50 µg/ml hIgG. Esto fue para bloquear cualquier anticuerpo en el sobrenadante que pudiera haberse desarrollado contra la porción Fc de la proteína de fusión. Los sobrenadantes

que no recibieron este tratamiento también fueron incluidos en el ELISA para servir como indicación de la cantidad de anticuerpo anti-Fc en cada muestra.

5 Transcurridas 4 horas de la etapa de bloqueo, se lavaron las inmunoplasmas 5 veces en PBS 0,05% tween y se añadieron los sobrenadantes puros, a 50 µl/pocillo. Se dejaron sobre la placa los sobrenadantes durante toda la noche a 4 °C o durante 3 horas a temperatura ambiente antes de lavar los pocillos 5 veces en PBS 0,05% tween. 50 µl of 0,5 µg/ml inmunoglobulinas anti-ratón-HRP (DAKO) en PBS 10 %, se añadió FCS a cada pocillo y se dejó durante una hora a temperatura ambiente antes de realizar 8 lavados finales en PBS 0,05% tween. Se detectó el anticuerpo unido con una solución de revelado ELISA y se registró A405 en un lector de inmunoplasma Tecan.

10 Para distinguir los anticuerpos desarrollados contra la porción Fc de la proteína de fusión de los dirigidos contra IL-17BR, se revistieron placas de control con hIgG y se añadieron los sobrenadantes siguiendo el protocolo descrito. Las muestras que dieron una alta A405 en placas revestidas con hIgG no fueron consideradas para posterior estudio.

15 Cribado por citometría de flujo de células COS7 transfectadas

Se clonaron por separado ADNc para genes IL-17Br murinos y humanos en el vector de expresión pME18S y se denominaron mL17BR-pME18S e hIL17BR-pME18S respectivamente.

20 Se colocaron en placa 2 x 10⁶ células COS7 en DMEM 10% FCS sobre un disco de 10 cm y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se mezclaron 4 µg de mL17BR-pME18S o hIL17BR-pME18S con 10 µl de lipofectamina en 500 µl de Optimem desprovisto de suero y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de añadirlo a células en placa. A continuación se incubaron las células a 37 °C durante 6 horas antes de añadir medio nuevo. Se recogieron las células para análisis FACS 48 horas después de la transfección.

25 Para el análisis FACS, se incubaron células transfectadas o no transfectadas con anticuerpos anti-IL17BR candidato a varias concentraciones en PBS 2 % FCS durante 30 minutos. A continuación, se lavaron las células antes de la incubación con FITC IgG anti-ratón (BD Pharmingen) a 2 µg/ml en PBS 2% FCS durante 30 minutos más. Finalmente, se lavaron las células dos veces en PBS 2 % FCS y se analizaron para determinar la expresión de IL-17Br en una máquina FACScalibur de Becton Dickinson.

30 Reactividad cruzada de D9.2

35 Se revistieron las placas ELISA con miembros de la familia IL-17R; IL-17RA, IL-17BR, IL-17RC, o IL-17RD, o IL-13R α , control (R&D Systems) a 2 µg/ml durante toda la noche a 4°C antes de lavado en PBS/0,05 % tween y bloqueo en PBS/10 % FCS a temperatura ambiente durante 4 horas. Se añadió D9.2 biotinilado a 1 µg/ml en PBS/10 % FCS y se incubaron durante toda la noche a 4°C. A continuación, se lavaron las placas antes de añadir estreptavidina-HRP y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las placas una última vez antes de añadir solución de revelado ELISA y de medir la absorbancia a 405 nm.

40 Ensayo de unión de anticuerpo monoclonal de ratón a IL-17BR humana

45 Se revistió una placa de micropocillos Nunc Maxisorp con IL-25 humana (hIL17e) (R&D Sys) a 0,5 µg/ml y se incubó durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa tres veces y después se bloqueó con Tris / 1 % BSA durante 1 hora. Se diluyó hIL17Br/Fc quimérico (R&D Sys) a 100 ng/ml. Se diluyó cada anticuerpo monoclonal de ratón purificado (x 100) en hIL17Br/Fc (100 ng/ml) hasta una concentración final de 1 µg/ml en una solución de hIL17Br/Fc a 100 ng/ml. Se incubó la mezcla [anticuerpo x hIL17Br/Fc] 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla [anticuerpo x hIL17Br/Fc] a una placa revestida con hIL17e-y se incubó 50 1 hora y 30 minutos antes de lavarse tres veces. Se añadió conjugado (Fc) anti-hIgG-HRP (Serotec) a la placa y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente antes de lavarlo tres veces y revelarlo con TMB. Se detuvo la reacción con 1 M HCL. Se realizó la lectura de la densidad óptica a 450 nm y se sustrajo la lectura del reactivo en blanco de todas las lecturas.

55 Ensayo de inhibición de IL-17Br/IL-25

Se extirparon los ganglios linfáticos mesentéricos de ratones BALB/c sin tratar previamente y se pasaron a través de tamices celulares de 70 µm para obtener una suspensión celular única. Se lavaron las células en PBS 2 % FCS y a continuación se empobrecieron de linfocitos T y linfocitos B. Esto se consiguió por incubación de las células con anticuerpo anti-CD19 y anti-CD3 biotinilados a 5 µg/ml, sobre hielo, durante 30 minutos e incubándolo después con perlas Dynabeads (Invitrogen) anti-biotina a una concentración de 4 perlas por célula durante 20 minutos a 4 °C. A continuación, se lavó la mezcla antes de pasar sobre un imán para separar los linfocitos T y B marcados de la fracción de células que no eran linfocitos T ni linfocitos B (NBNT). Se sometió a ensayo la pureza de la fracción NBNT por FACS, se manchó con B220, CD4 y CD8.

A continuación, se colocaron en placa células NBNT, a 3×10^5 células/pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se incubaron durante 72 horas en RPMI 10 % en solitario o RPMI 10 % FCS con 10 ng/ml de IL-25. Se añadieron a los pocillos anticuerpos bloqueantes IL-17BR candidato en diluciones en serie desde una concentración máxima de 2 µg/ml y se incubaron durante 1,5 horas antes de añadir 10 ng/ml de IL-25 a los pocillos. A continuación, se incubaron a 37 °C durante 72 horas antes de recoger los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para determinar el contenido de proteína IL-13 por ELISA Quantikine (R&D Systems).

Para linfocitos CD4⁺ (T y/o NKT), se tomaron los bazos de ratones BALB/c de tipo silvestre sin tratar previamente y se reparó una suspensión celular única. Se llevó a cabo la lisis de glóbulos rojos antes de lavar las células en tampón MACS (Miltenyi Biotec). Se llevó a cabo el aislamiento de linfocitos CD4⁺ por selección positiva utilizando CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se cultivaron linfocitos CD4⁺ a 1×10^6 células/ml en placas de 96 pocillos o bien en RPMI solo o bien en RPMI suplementado con 10 ng/ml de IL-25 con o sin D9.2 a 1 µg/ml. Se cultivaron las células durante 72 horas y, a continuación, se tomaron los sobrenadantes para análisis de los niveles de proteína IL-13 por ELISA Quantikine (R&D Systems).

Bioensayos de línea celular de carcinoma renal

Se obtuvieron células de carcinoma renal TK-10 humanas del National Cancer Institute (NCI). Se obtuvieron células RENCA del Cell Biology Services, Centocor R&D. Se mantuvieron ambas líneas celulares en medio de crecimiento DMEM con 10 % FCS a 37 °C, 5% CO₂ en una atmósfera humidificada. Se colocaron las células en placas tratadas con cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en un volumen total de 100 µl de medio de crecimiento completo. Después de incubarlas durante toda la noche, se lavaron las células con 1 X PBS y después se incubaron con 100 ng/ml de IL-25 y 10 ng/ml TNF-α en medio de suero reducido OptiMEM, o medio solamente de control, durante 24 horas. Se recogió el sobrenadante de células 20-24 horas después de la estimulación con IL-25 y se almacenó a -20°C para posterior análisis de la liberación de KC/IL-8 soluble utilizando ELISA Quantikine de ratón para KC o ELISA Quantikine humana para IL-8 (R&D Systems).

Se sometieron a ensayo D9.2 o IgG1 como control para determinar la capacidad para evitar la liberación de IL-8 mediada por IL-25 (KC). Para los experimentos de inhibición se incubó previamente una cantidad constante de IL-25 (100 ng/ml) con diversas concentraciones de D9.2 o anticuerpo de control IgG1 de ratón anti-c-myc (clon 9E10.2) durante 30-60 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de las correspondientes células. Se añadió TNF-α (10 ng/ml) a las células inmediatamente antes de la adición de la proteína IL-25/D9.2. La determinación de la liberación de IL-8 (KC) se llevó a cabo 24 horas después de la estimulación, tal como se ha descrito antes.

Ratones

Se obtuvieron ratones BALB/c para su uso en el modelo experimental de asma alérgica de Harlan Reino Unido, y ratones BALB/c para su uso en el modelo experimental de IBD, de Charles River. Se mantuvo a los ratones en las instalaciones del SABU/CBS/Ares-MRC o el National Heart and Lung Institute en entornos desprovistos de patógenos específicos. Todos los experimentos con animales descritos en este informe fueron emprendidos con la aprobación del Ministerio del Interior del Reino Unido.

Sensibilización y exposición a alérgeno

Para el modelo experimental de asma alérgica, se sensibilizaron ratones BALB/c, ratones de tipo silvestre o ratones con silenciamiento de IL-17BR sobre antecedente de ratones BALB/c por administración intraperitoneal de OVA (20 µg/inyección) formando complejo con alum o 1:1 PBS:alum (controles), en los días 0 y 12. La administración por aerosol de PBS o 1% OVA se llevó a cabo los días 19, 20, 21 durante 20 minutos al día. El día 22 se sacrificó a los animales y se recogieron los tejidos.

Para el modelo experimental de IBD, se sensibilizaron ratones BALB/c por aplicación cutánea de una solución al 4 % (p/v) de oxazolona (OXA) en 100 % de etanol o etanol solamente (controles), el día 0. Se llevó a cabo la administración intra-rectal de 3 % (p/v) de solución de oxazolona en 50 % de etanol o 50 % de etanol solamente (controles) el día 7. El día 9, se sacrificó a los animales y se recogieron los tejidos.

Administración de anticuerpos anti-IL-17BR

En el modelo experimental de asma alérgica, para los ratones que recibieron el tratamiento de anticuerpo, se aplicó una inyección intraperitoneal de 250 µg de D9.2 o anticuerpo de control IgG1 de ratón anti-c-myc (clon 9E10.2) en PBS dos horas antes de cada nebulización. Cada uno de los ratones recibió tres dosis de anticuerpo.

En el modelo experimental de IBD, para los ratones que recibieron el tratamiento de anticuerpo, se aplicó una inyección intraperitoneal de 500 µg de D9.2 o un anticuerpo de control IgG1 de ratón anti-KLH en PBS 24 horas antes de la sensibilización (día -1) y el desafío (día 6). Así pues, cada ratón recibió dos dosis de anticuerpo.

Evaluación AHR

5 En relación con la figura 8(e), se sensibilizó a los ratones por administración intraperitoneal (i.p.) de ovoalbúmina con bajo contenido de endotoxina y se los desafió diariamente durante 6 días por nebulización con PBS aerosolizado (control) u OVA.

10 Se administró a los ratones que recibieron tratamiento con anticuerpo D9.2 una inyección intraperitoneal de 250 mg de D9.2 o anticuerpo de control IgG1 de ratón anti-c-myc (clon 9E10.2) en PBS 2 horas antes de cada una de las 3 últimas nebulizaciones. 24 horas después del desafío con aerosol final, se valoró AHR utilizando un pletismógrafo de cuerpo entero restringido (EMMS, Reino Unido). Se anestesió a los animales, se les realizó una traqueotomía y se los ventiló (ventilador MiniVent 845, EMMS, Reino Unido) a una velocidad de 175 respiraciones/min, con un volumen corriente de 200 ml/impulso. Después de registrar la resistencia pulmonar basal estable durante 3 minutos, se administraron concentraciones crecientes de cloruro de acetil- β -metilcolina (metacolina) (Sigma-Aldrich) con un aerosol durante 10 segundos con un nebulizador ultrasónico y se registró la resistencia pulmonar durante un período de 3 minutos. Se utilizó el software eDag para analizar la resistencia de las vías respiratorias, el cumplimiento y los parámetros pulmonares normales.

Reestimulaciones del ganglio linfático mediastinal

20 Se presionaron ganglios linfáticos mediastinales de ratones tratados con PBS o con OVA a través de tamices celulares de 70 μ m para obtener una suspensión celular única. Se hizo el recuento de las células y se colocaron en placa, a 3×10^5 células/pocillo, sobre placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se cultivaron las células durante 72 horas en RPMI 10% FCS en solitario, o en presencia de 100 μ g/ml OVA. A continuación, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para determinar la concentración de IL-13 utilizando un kit de ELISA Quantikine (R&D Systems).

Evaluación IBD

30 En lo que se refiere a la Figura 9, se sensibilizó a ratones por aplicación cutánea de una solución de oxazolona en etanol el día 0 y se desafiaron con una solución de oxazolona en etanol el día 7. Los controles recibieron solo etanol. Se administró a los ratones que habían recibido tratamiento con anticuerpo una inyección intraperitoneal de D9.2 o anticuerpo IgG1 de ratón anti-KLH (control) el día 1 y el día 6. El día 9, se sacrificó a los animales y se recogieron los tejidos. (En las Figuras 9(a) y 9(b), los días 7, 8 y 9 se enumeran como los días 0, 1 y 2 respectivamente.)

35 En los días 7, 8 y 9, se pesó a los ratones y se evaluó su aspecto general y su conducta para la asignación de una puntuación clínica de 0 a 3 para cada animal, sobre la base del método descrito en Wang et al., 2004, estableciéndose la puntuación clínica el día 7 en 0 (Figura 9b). El día 9, se sacrificó a los ratones y se recuperó el colon de cada uno de los ratones; se inspeccionó y se midió (Figura 9(c)).

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos contra IL-17BR

45 Inicialmente, los autores de invención trataron de generar anticuerpos inmunizando ratones con péptidos sintéticos derivados de la secuencia de aminoácidos de IL-17BR humana. A pesar de la generación de anticuerpos anti-péptido monoclonales, no pudieron producir anticuerpos que reconocieran la proteína IL-17BR humana madura. Trataron entonces de generar anticuerpos contra una proteína de fusión de la proteína IL-17BR humana inmunizando ratones de tipo silvestre. A pesar de las múltiples inmunizaciones y las fusiones del hibridoma, no pudieron generar anticuerpos de alta afinidad contra IL-17BR.

50 Los ratones también expresan una forma de IL-17BR y los inventores lanzaron la hipótesis de que la incapacidad de desarrollar un anticuerpo útil tal vez pudiera estar limitada por la falta de nuevos epítomos entre las moléculas IL-17BR de ratón y humanas. Generaron una línea de ratón con déficit de IL-17BR que no pudiera expresar ya IL-17Br. Se diseñaron ratones con déficit de IL-17BR para eliminar todas las formas de IL-17BR incluyendo variantes empalmadas alternativamente. El alto grado de conservación de la interfaz de unión entre IL-17BR humana y de ratón puede reducir la probabilidad de desarrollar anticuerpos bloqueadores en ratones de tipo silvestre, de manera que la eliminación de IL-17BR endógena puede facilitar el desarrollo de anticuerpos contra el sitio de unión de ligando del IL-17BR. Esta estrategia también aumentó la posibilidad de desarrollar un anticuerpo para IL-17BR que pudiera bloquear la unión de IL-25 tanto humano como de ratón. Esto es útil ya que es posible determinar por ensayo la eficacia de anticuerpos reactivos en reacción cruzada en modelos de ratón de la enfermedad.

60 Una vez generados y caracterizados los animales con déficit de IL-17BR, se llevó a cabo la inmunización con IL-17BR-Proteína de fusión Fc. Esta estrategia demostró ser más acertada que el uso de ratones de tipo silvestre, pero siguió requiriendo el cribado de un gran número de hibridomas para identificar anticuerpos candidato.

65 Se rastreó un gran panel de anticuerpos, generados en ratones *il17br*^{-/-} inmunizados contra IL-17BR-Proteína de fusión Fc de ratón para determinar la unión a IL-17BR humana y de ratón por ELISA. Uno de los anticuerpos anti-IL-17BR identificados (D9.2) se unió perfectamente a IL-17BR murina y humana según ELISA (Figura 1) al igual que

proteína IL-17BR tanto de ratón sin tratar previamente como humana expresada en células COS transfectadas con ADNc de IL-1BR de ratón o ADNc IL-17BR humana (Figura 2).

Ejemplo 2: Ensayo *in vitro* de D9.2

5 Se determinó por ensayo la especificidad de D9.2 evaluando la interacción de D9.2 con otros miembros de la familia de receptores IL-17. D9.2 no reaccionó en reacción cruzada con receptor IL-17A (IL-17RA), receptor IL-17C (IL-17RC) o receptor IL-17D (IL-17RD) (Figura 3).

10 El cribado identificó varios anticuerpos que se unieron a IL-17BR, sin embargo, solamente D9.2 fue capaz de inhibir la interacción entre IL-25 humano e IL-17Br humana (Figura 4).

15 Se sometió a ensayo D9.2 para determinar su capacidad de inhibir la actividad biológica de IL-25. IL-25 induce la liberación de citocinas de tipo 2, tales como IL-13, inicialmente, desde células que no son linfocitos B ni linfocitos T (NBNT) innatas (Fallon *et al.*, 2006; Fort *et al.*, 2001) y desde linfocitos T (Angkasekwinai *et al.*, 2007). Por otra parte, tanto TK-10 humano (línea celular de carcinoma renal) como las líneas celulares de carcinoma renal de ratón (RENCA) secretan la quimiocina IL-8 (conocida como KC en el ratón) como respuesta a la estimulación con TNF- α y IL-25 (Sayers *et al.*, 1990).

20 En un bioensayo *in vitro*, D9.2 inhibió la bioactividad desencadenada por la unión de IL-17BR/IL-25, es decir, la producción dependiente de IL-25 de IL-13 por células NBNT de ratón primario (Figura 5^a) y linfocitos CD4⁺ T/NKT (Figura 5b).

25 Por otra parte, D9.2 inhibió la producción de KC desde células RENCA de ratón estimuladas con IL-25 *in vitro* (Figura 6).

Cabe destacar que D9.2 también fue capaz de inhibir la actividad biológica de IL-25 humana. D9.2 inhibió la secreción de IL-8 dependiente de IL-25 a través de células TK-19 humanas dependiendo de la dosis (Figura 7).

30 Se investigó mejor la combinación de estas propiedades en sistemas *in vivo* para demostrar la utilidad en el tratamiento de asma. Otros experimentos adicionales demostraron la eficacia del tratamiento de IBD.

Ejemplo 3: Modelo experimental de asma alérgica

35 En primer lugar se sensibilizó ratones BALB/c con antígeno OVA, antes de desafiarlos con OVA aerosolizado. Los ratones BALB/c sensibilizados y desafiados desarrollaron un fenotipo de asma distintivo, caracterizado por un aumento de AHR tras la exposición al agente provocador metacolina, infiltración de eosinófilos de las vías respiratorias, hiperplasia de célula caliciforme y secreción de IgG en suero, en comparación con los ratones BALB/c de control desafiados con PBS.

40 Empleando este modelo, se trataron los ratones BALB/c en la fase de desafío o bien con IgG anti-c-myc de control isotipo (clon 9E10.2) o bien con clon D9.2 anti-IL-17BR. Cabe destacar que la administración de D9.2 redujo los niveles de IL-13 producidos tras el desafío con antígeno e IL-5 producida tras la reestimulación con antígeno a niveles similares a los encontrados en ausencia de desafío con antígeno o en ratones con déficit de IL-17BR (Figuras 8a y b). Asimismo se redujo el número de células productoras de IL-13 en los pulmones de los ratones desafiados con antígeno a esos niveles (Figura 8c). De modo similar, se observó también el bloqueo de la expansión de linfocitos T gamma/delta relacionada con la enfermedad tras el tratamiento con D9.2 (Figura 8d). Jin *et al.* (2007, J Immunol.) han demostrado que la ausencia de linfocitos T gamma/delta conduce a una incapacidad para desarrollar AHR, lo que sugiere que el anticuerpo anti-IL-17BR puede inhibir dos rutas conocidas como esenciales para el desarrollo del asma – la producción de IL-13 y la capacidad de respuesta de linfocito T gamma/delta. Asimismo, el tratamiento con D9.2 redujo la hiperreactividad de las vías respiratorias, una característica clave del asma humano, en un modelo de asma de ratón.

Ejemplo 4: Modelo experimental de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD)

55 En primer lugar, se sensibilizó ratones BALB/c con hapteno oxazolona (OXA) antes de desafiarlos por inyección intra-rectal con la misma sustancia química. Los ratones sensibilizados y desafiados desarrollaron un fenotipo IBD distintivo, caracterizado por pérdida de peso, acortamiento del colon e inflamación en el intestino grueso, acompañado de heces sanguinolentas (en comparación con los controles con etanol solamente).

60 Empleando este modelo, se trataron los ratones BALB/c antes de la sensibilización y el desafío con OXA o bien con IgG1 anti-KLH de control isotipo o bien con anti-IL-17BR (clon D9.2). La administración de D9.2 redujo el índice patológico de los animales, con el resultado de una menor tasa de mortalidad (Figura 9(a) y mejoró la puntuación clínica, es decir, redujo los signos clínicos de IBD, manifestados como una pérdida de peso, así como la conducta y el aspecto de los animales Figura 9(b)). Asimismo, D9.2 protegió contra el acortamiento del colon como

65

consecuencia de la inflamación y la hemorragia (Figura 9(c)) y los colonos de ratones tratados con D9.2 presentaron una menor inflamación y hemorragia en comparación con los ratones que recibieron anticuerpo de control anti-KLH.

Ejemplo 5: Clonación y secuenciación de D9.2

5 Para clonar la secuencia de inmunoglobulina de D9.2, se aisló ARN del clon celular D9.2 y se preparó ADNc por reacción de transcripción inversa.

10 Se amplificó el ADNc (IgH) de cadena pesada de inmunoglobulina por PCR utilizando un cebador de región VH 5' conservado, MHV2 (SEQ ID NO: 11) en combinación con un cebador de región constante IgG1 MHCG1 (SEQ ID NO:12).

15 De manera similar, se amplificó la cadena ligera de inmunoglobulina (IgK) utilizando cebadores de región IgK 5' conservados MKV3 (SEQ ID NO: 13) en combinación con el cebador de región constante kappa MKC (SEQ ID NO: 14).

Se utilizó la polimerasa termoestable Phusion (NEB F-531L) para todas las reacciones PCR.

20 Se ligaron directamente los productos de amplificación D9.2 de VH2 + MHCG1 en el vector pCRII®Blunt-TOPO® utilizando un kit TOPO-blunt cloning® (Cat 45-0245), al igual que los productos de amplificación de la reacción de amplificación de cadena ligera. Se clonaron las construcciones de bacteria TOP10 de *E. coli* transformadas con el vector pCRII-blunt ligado sobre placas de agar LB-ampicilina-XGal, recogiendo colonias blancas en una rejilla de agar y hacia la mezcla de cribado de PCR. Se amplificaron por PCR los insertos de plásmido clonados. Se sometieron a electroforesis en gel los productos de amplificación y se identificaron los productos predichos. Se procesaron durante toda la noche cultivos (5 ml) de cada clon dando lugar al producto de amplificación por PCR del tamaño correcto utilizando el protocolo del kit QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol (cat 27106), para producir mini-preparaciones de plásmido de ADN. Se secuenció cada plásmido seleccionado en ambas direcciones utilizando cebadores directos e inversos M13.

30 Se repitió el ciclo completo de RT-PCR, clonación y análisis de secuencia de ADN para obtener dos grupos completamente independientes de información de secuencia para cada cadena de inmunoglobulina.

35 La secuencia de nucleótidos deducida completa de genes VH y *Vkappa* se muestra como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 respectivamente. Estas secuencias incluyen las secuencias líder al comienzo de cada segmento de gen variable que codifica una secuencia de señal que se utiliza para transportar las cadenas de anticuerpo recién sintetizadas en el retículo endoplásmico; no están presentes en las cadenas pesada y ligera finales.

Inmunología y reactivos biológicos moleculares

Artículo	Proveedor R.U.	Número de catálogo	Número de lote
Células <i>E. coli</i> 10β competentes	NEB	C3019H	
Agarosa (UltraPure™)	Invitrogen	15510-027	3048948
Albúmina bovina (BSA)	Sigma	A7030	086K1230
Ampicilina	Sigma	A-9518	63H0992
IL-25 (murina)	R&D Systems		
IL-25 (humana)	R&D Systems		
Oligonucleótidos	Sigma	n.a.	
Oxazolona	Sigma	E0753	
Comprimidos PBS	Sigma	P4417	017K8212
Kit Miniprep QIAprep Spin	Qiagen	27106	127150290
Kit ELISA IL-13 Quantikine Murino	R&D Systems	M1300CB	
Kit Quick Ligation	NEB	M2200s	
Kit Mutagénesis dirigida sitio II XL QuikChange®	Stratagene	200522-5	0870486
Perlas dynabeads marcadas con estreptavidina	Invitrogen		
Mancha de gel de ADN SYBR Safe	Invitrogen	33102	55081A
kit TOPO-blunt cloning®	Invitrogen	45-0245	1311906
X-Gal	Promega	V394A	20965701
rhIL-17RD (Sef)	R&D Systems	2275-IL	NBR015031
rmIL-17RD.(Sef)	R&D Systems	2276-ML	NAF014111
rhIL-17RC	R&D Systems	2269-IL	NCJ0208081
rmIL-17RC	R&D Systems	2270-ML	
rhIL-17BR-Fc	R&D Systems	1207-BR	
rmIL-17BR-Fc	R&D Systems	1040-BR	
rhIL-17RA-Fc	R&D Systems	177-IR	

rmIL-17RA-Fc	R&D Systems	4481-MR	
Kit ELISA CXCL1/KC ratón Quantikine	R&D Systems	MKC00B	
Kit ELISA CXCL8/IL-8 Humano Quantikine	R&D Systems	D8000C	

Abreviaturas:

5	AHR	Hiperreactividad de las vías respiratorias
	°C	Centígrado
	bp	Pares de bases
	CD	Enfermedad de Crohn
	CDR	Región determinante de complementariedad
	DMEM	Medio de Eagle modificado con Dulbecco
10	DNA	Ácido desoxirribonucleico
	ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
	FACS	Separación de células activadas por fluorescencia
	FCS	Suero fetal bovino
	g	Gramos
15	h	Hora
	HRP	Peroxidasa de rábano rústico
	IBD	Enfermedad inflamatoria intestinal
	Ig	Inmunoglobulina
	i.p.	Intraperitoneal
20	KLH	Hemocianina de lapa californiana
	mAb	Anticuerpo monoclonal
	min	Minuto
	NBNT	Células no linfocitos B/ No linfocitos aisladas de ganglio linfático mesentérico de ratón
	nm	Nanómetro
25	OD	Densidad óptica
	OVA	Ovoalbúmina
	OXA	Oxazolona
	PBS	Solución salina tamponada con fosfato
	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
30	RENCA	Carcinoma renal
	RH	Cadena pesada recombinante
	RK	Cadena kappa recombinante
	TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
	UC	Colitis ulcerosa
35	VH	Región variable de cadena pesada de inmunoglobulina
	VL	Región variable de cadena ligera de inmunoglobulina
	VK	Región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina

Secuencias

40 *SEQ ID NO: 1 secuencia de nucleótidos que codifica VH D9.2*

cttcttcttagcaacacctacatgtgtccactcccaggtccaattgcagcagcctggggctgagctggt
gaggcctggggcttcagtgaaagctgtcctgcaagacttctggctacacggttcatcagttattggatgaa
ctgggttaagcaggggctgagcaaggccttgagtggattggaagaattgatccttacgatagtgaat
tcagtacaatcaaaagttcaaggacaaggccatattgactgtagacaaatcctccagcgcagcctacat
gcaactcatcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaagatcggggggttctgactg
gtttgcgtactggggccaagggactctggtcactgtctctgcagccaaaacgcacccccatcagtcct
tccactgaaggcgcaattccagcacactggcgccgcttac

45 *SEQ ID NO: 2 secuencia de aminoácidos VH D9.2*

FFLATPTCVHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKTSGYTFISYWMNWVKQGGPEQGLEWIGRIDPYDSE
IQYNQKFKDKAILTVDKSSAAYMQLISLTSEDSAVYYCARSGGFDWFAFWGQGLVTVS

SEQ ID NO: 3 secuencia de nucleótidos que codifica VL D9.2

atgagtgtgctcactcaggtcctggcgttgctgctgctgtggcttacagatgccagatgtgacatccag
 atgactcagtcctccagcctccctatctgtatctgtgggagaaactgtcaccatcacatgtcgagcaagt
 gagaatattaacagtaatttagcatggtatcagcagaaaaagggaaaatctcctcagctcctggtctat
 gatgtaacaaacttagcagatggtgtgccatcaaggttcagtgccagtgatcaggcacacaatattcc
 ctcaagatcaacagcctgcagtcgaagattttgggagttattactgtcaacatttttggcgtcctccg
 tacacgttcggaggggggaccaatctggaaataaaa

5 SEQ ID NO: 4 secuencia de aminoácidos VL D9.2

MSVLTQVLALLLLWLT DARCDIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENINSNLAWYQQKKGKSPQLLVY
 DVTNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYCQHFWRPPYTFGGGTNLEIK

10 SEQ ID NO: 5 secuencia de aminoácidos CDR1 VH D9.2
 SYWMN

SEQ ID NO: 6 secuencia de aminoácidos CDR2 VH D9.2
 RIDPYDSEIQYNQKFKD

SEQ ID NO: 7 secuencia de aminoácidos CDR3 VH D9.2
 SGGFDWFAY

15 SEQ ID NO: 8 secuencia de aminoácidos CDR1 VL D9.2
 RASENINSNLA

SEQ ID NO: 9 secuencia de aminoácidos CDR2 VL D9.2
 DVTNLAD

20 SEQ ID NO: 10 secuencia de aminoácidos CDR3 VL D9.2
 QHFWRPPYT

SEQ ID NO: 11 secuencia de cebador MHV2
 atgggatggagctratcatsytctt (r=a/g, s=c/g, y=t/c)

SEQ ID NO: 12 secuencia de cebador MHCG1
 cagtggatagacagatggggg

25 SEQ ID NO: 13 secuencia de cebador MKV3
 atgagtgtgctcactcaggtcctggsgttg

SEQ ID NO: 14 secuencia de cebador MKC
 actggatggtgggaagatgg

30 Referencias

1. Angkasekwina, P., et al., J Exp Med 204, 1509-1517 (2007)
2. Ballantyne, S. J., et al., J Allergy Clin Immunol (2007)
3. Fallon, P. G., et al., J Exp Med 203, 1105-1116 (2006).
- 35 4. Fort, M. M., et al., Immunity 15, 985-995 (2001).
5. Lajoie-Kadoch, S., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290, L1238-46.
6. Lee, J., et al., J Biol Chem 276, 1660-1664 (2001).
7. Moseley, T. A., et al., Cytokine Growth Factor Rev 14, 155-174 (2003).
8. Owyang, A. M., et al., (2006) J Exp Med 203, 843-849.
- 40 9. Pan, G., et al., J Immunol 167, 6559-6567 (2001).
10. Shi, Y., et al., J Biol Chem 275, 19167-19176 (2000).
11. Tian, E., et al., Oncogene 19, 2098-2109 (2000).
12. Wang, Y. H., et al., J Exp Med 204, 1837-1847 (2007).
13. Rickel E. A., et al., J Immunol 181, 4299-4310 (2008).
- 45 14. Sayers T. J., et al., Cancer Res 50, 5414-5420 (1990).
15. Jin N., et al., J Immunol 179, 2961-2968 (2007).
16. Heller, F., et al., Immunity 17:629-638 (2002).
17. Fichtner-Feigl, S., et al., Mucosal Immunology 1 Suppl 1:S24-27 (2008).
18. Buning, C., et al. Eur J Immunogenet 30:329-333 (2003).
- 50 19. Hanauer, S.B., Alimentary pharmacology & therapeutics 27 Suppl 1:15-21 (2008).
20. Wang, X., et al., Chinese Journal of Digestive Diseases 5, 165-168 (2004)

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que se une específicamente al IL-17BR murino y/o humano y que comprende:
 - 5 un dominio VH que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; y,
 - 10 un dominio VL que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.
2. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 1, en la que el dominio VH comprende:
 - 15 (a) una región marco humana; o
 - (b) SEQ ID NO: 2
3. La molécula de anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es reactivo en reacción cruzada tanto con IL-17Br humano como con IL-17BR murino.
- 20 4. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 4, en donde el dominio VL comprende:
 - (a) una región marco humana; o
 - (b) SEQ ID NO: 4.
- 25 5. La molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂, scFv.
6. La molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una región constante de anticuerpo.
- 30 7. La molécula de anticuerpo de la reivindicación 6:
 - (a) en la que la región constante es una región constante de IgG1 o IgG4; o
 - (b) que comprende un anticuerpo completo.
- 35 8. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Un método para producir una molécula de anticuerpo, comprendiendo el método el cultivo de células huésped que llevan un vector de expresión para la expresión de la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el vector de expresión el ácido nucleico de la reivindicación 8, unido operativamente a un promotor, en condiciones para la producción de dicha molécula de anticuerpo,
- 40 en donde el método comprende además opcionalmente el aislamiento de dicha molécula de anticuerpo en donde el método comprende además opcionalmente la formulación de la molécula de anticuerpo en una composición que incluye al menos un componente adicional.
- 45 10. Una composición que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la composición se presenta opcionalmente en forma de un polvo liofilizado.
- 50 11. Una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición de la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento o la prevención de:
 - 55 (a) asma;
 - (b) enfermedad inflamatoria intestinal
 - (c) enfermedad inflamatoria intestinal que es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

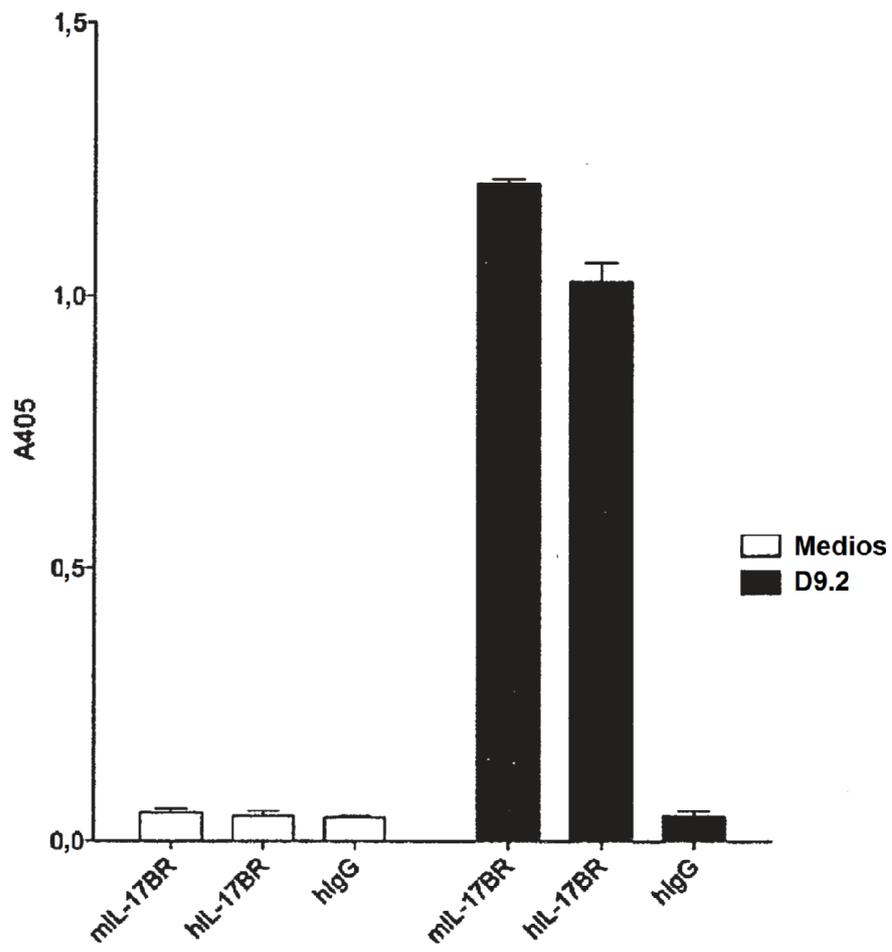


Figura 1

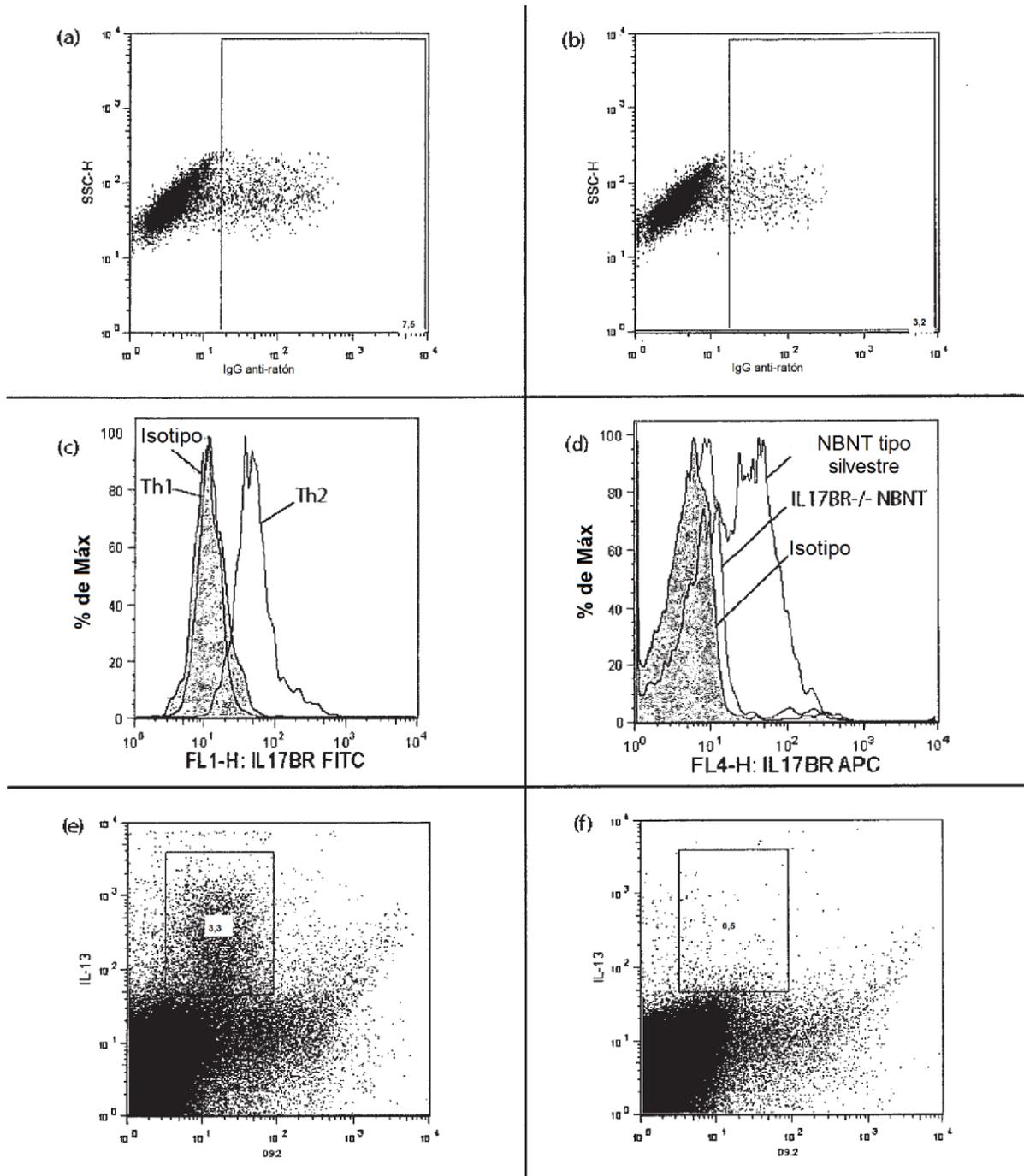


Figura 2

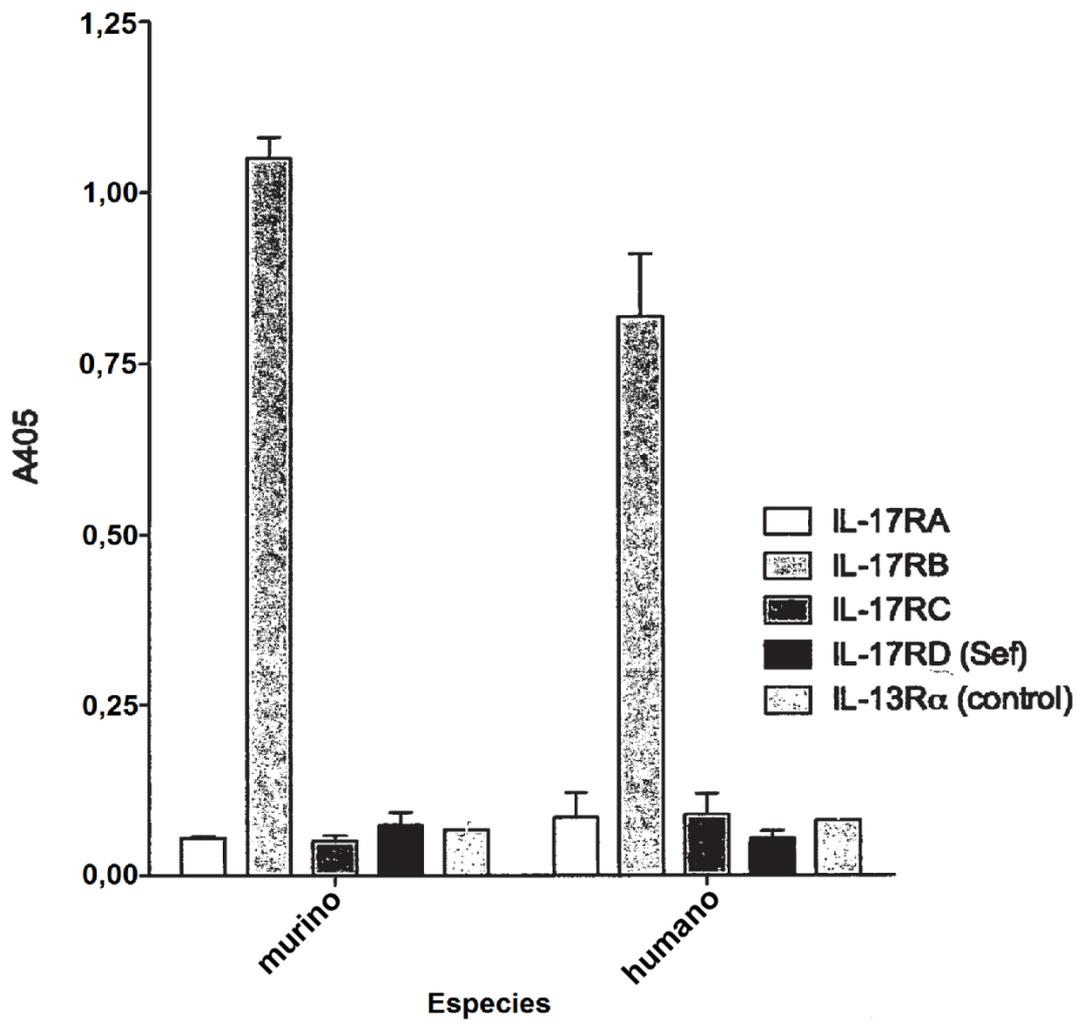


Figura 3

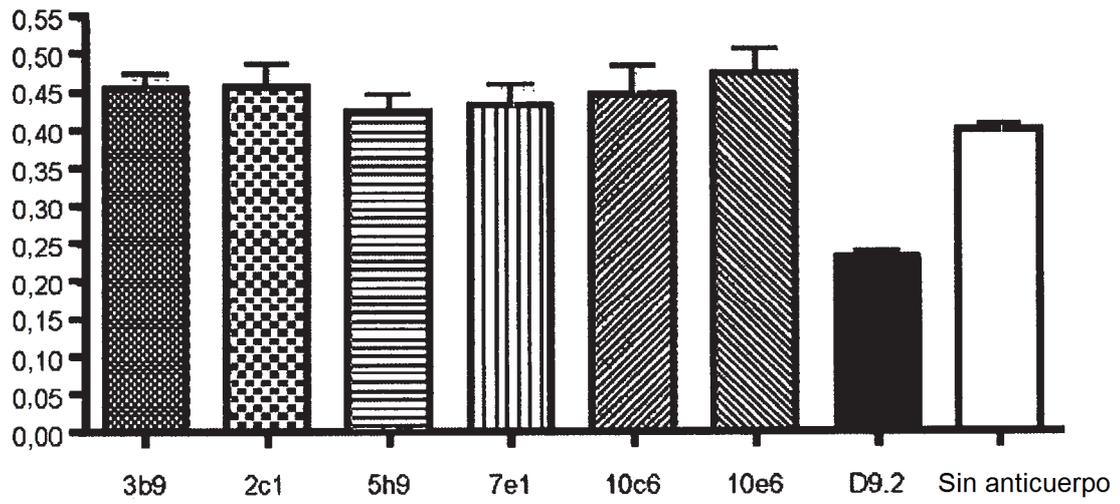


Figura 4

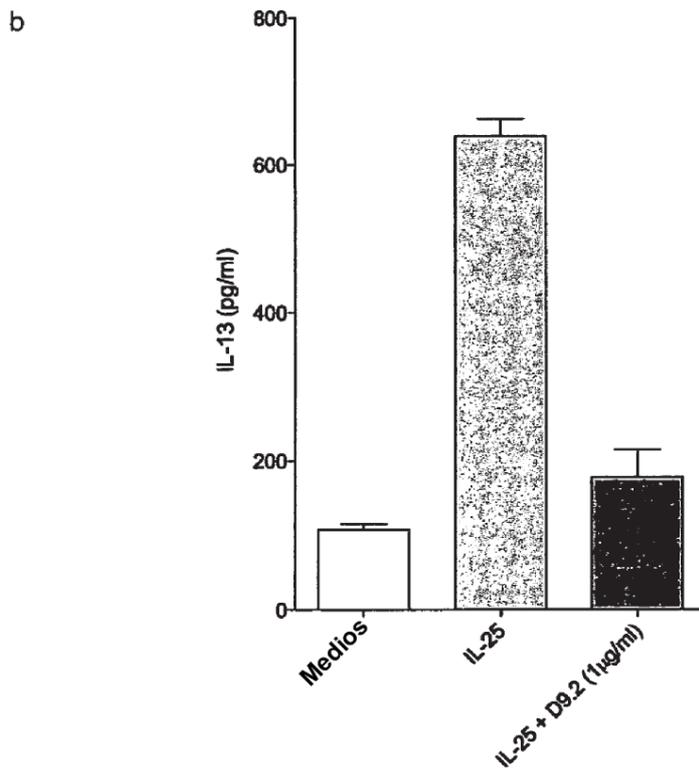
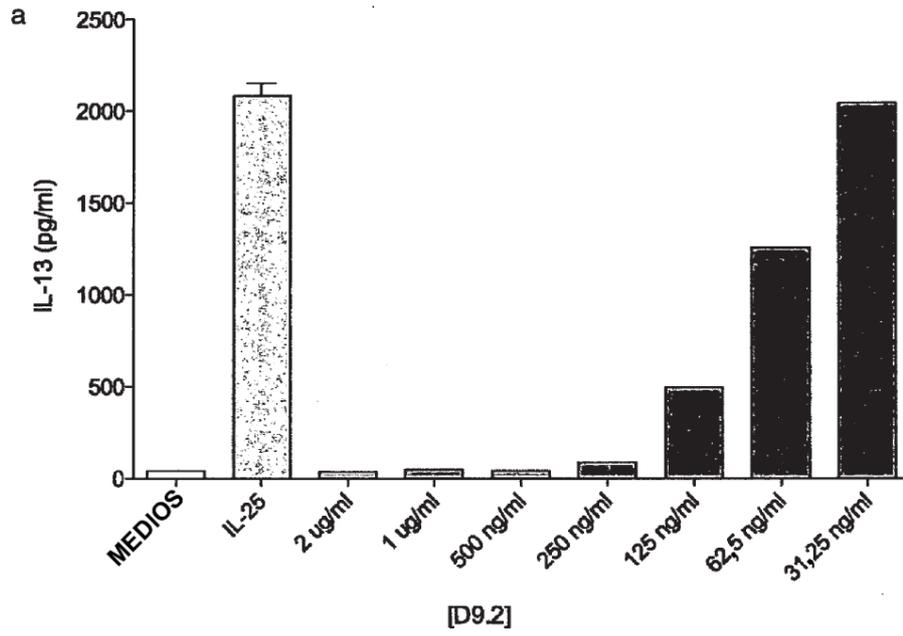


Figura 5

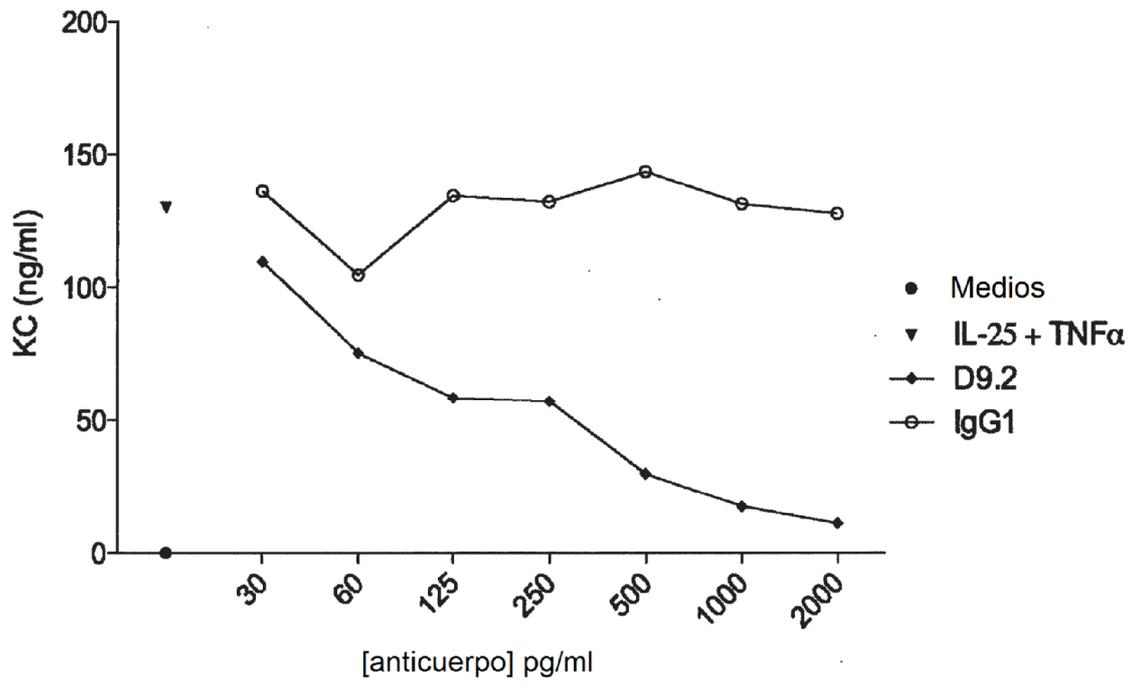


Figura 6

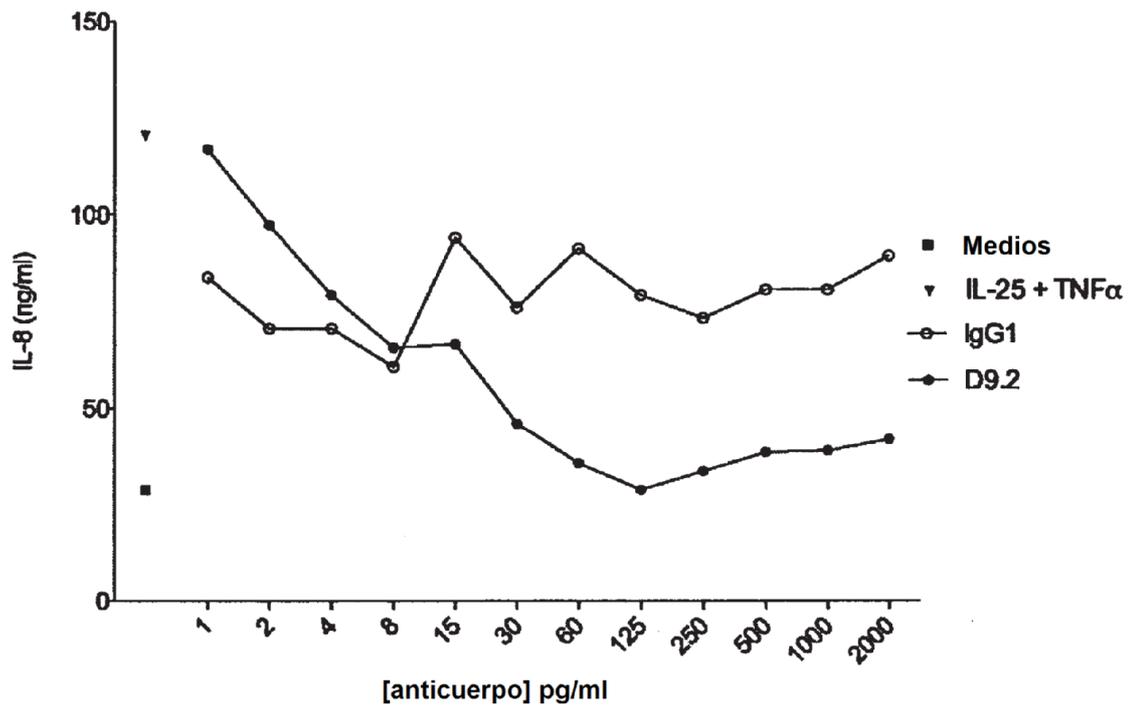


Figura 7

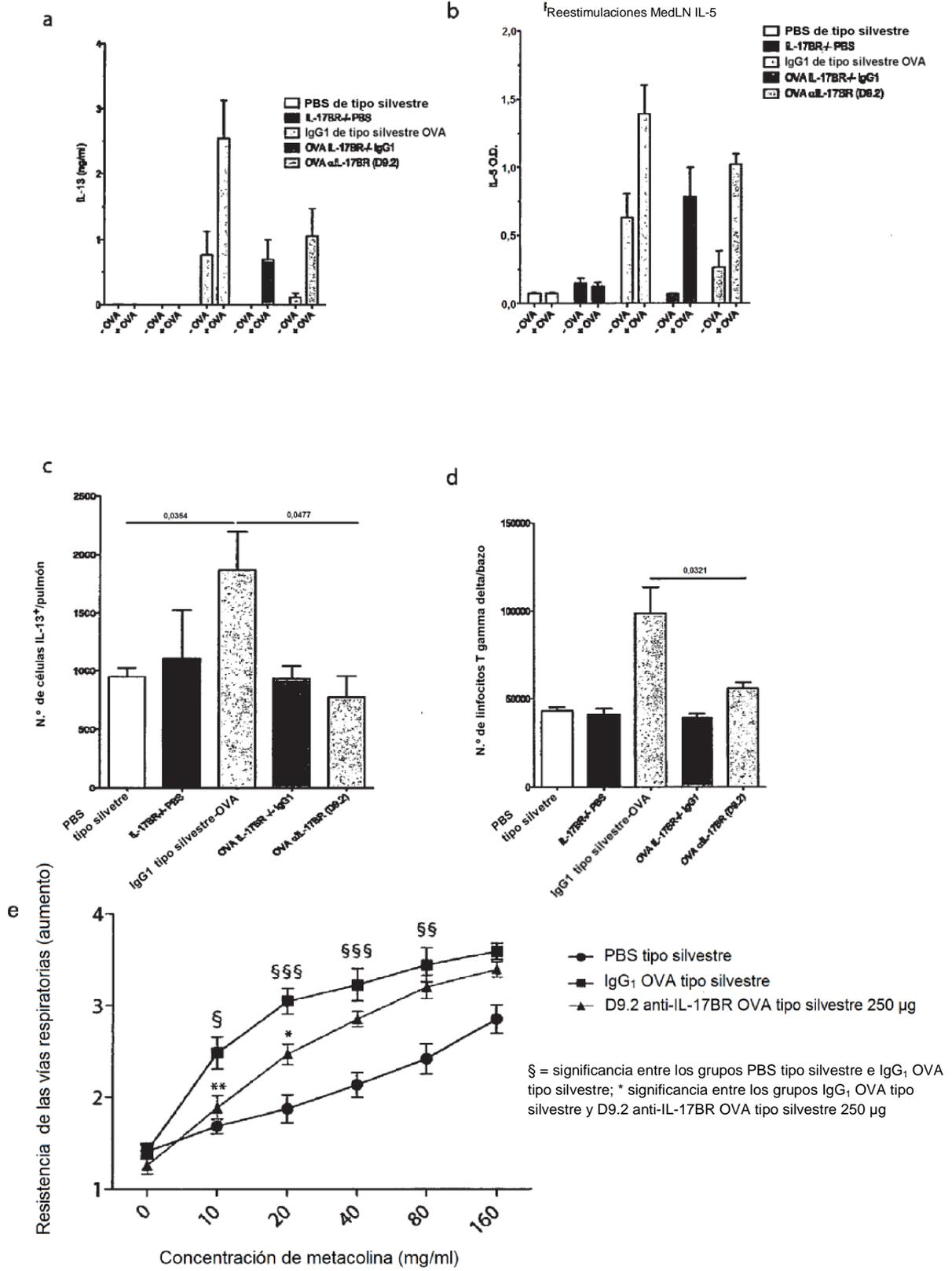


Figura 8

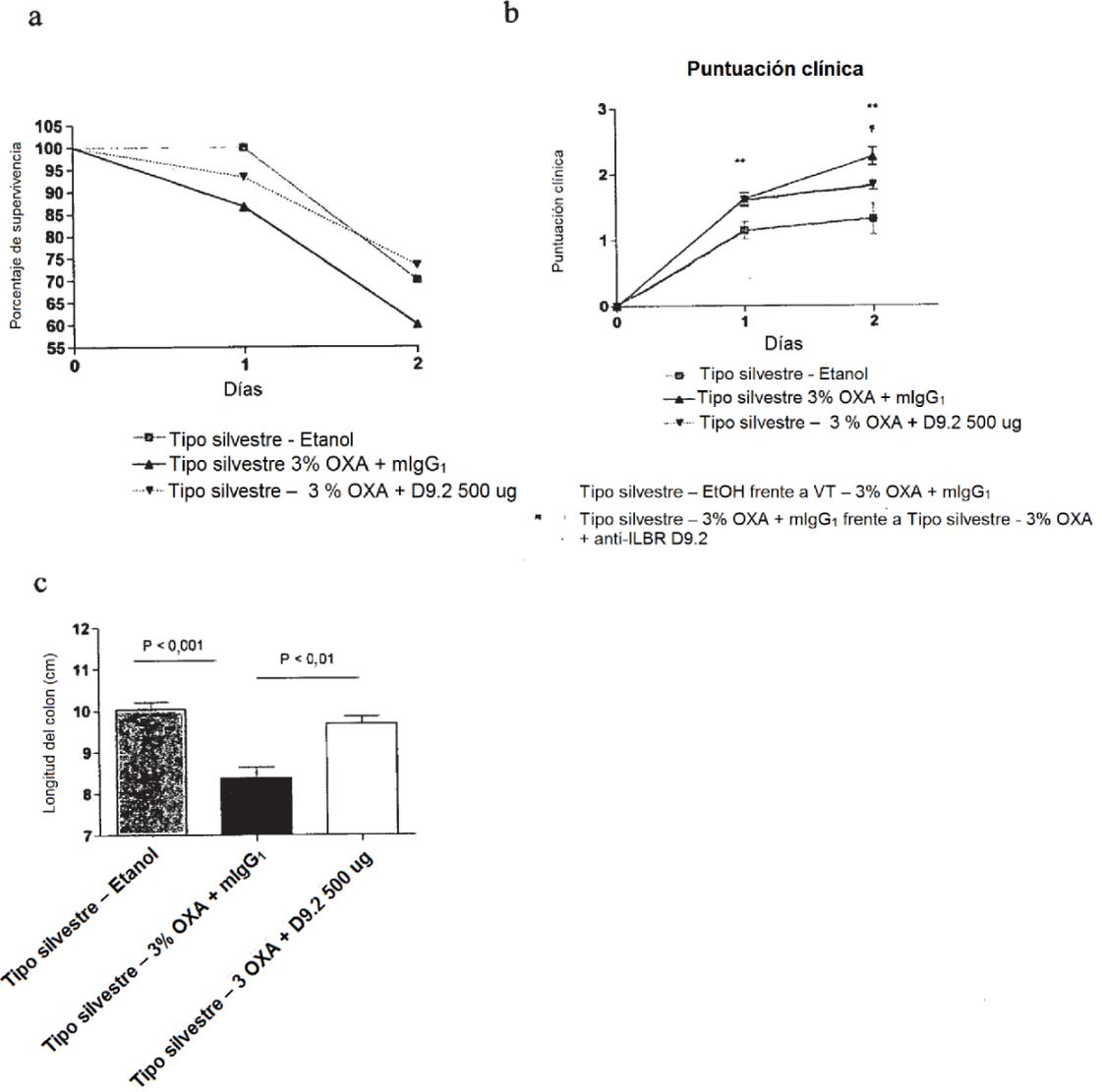


Figura 9