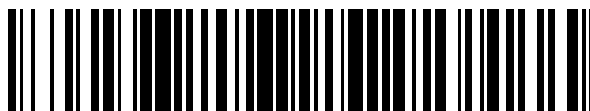


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 245**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2005 E 15156029 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2902039**

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

30 Prioridad:

**05.08.2004 GB 0417487**

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

**31.07.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 677 245 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

## Anticuerpos Antagonistas de IL-17

Esta invención se relaciona con una molécula de unión a IL-17, en particular un anticuerpo para la IL-17 humana, más preferiblemente un anticuerpo humano para la IL-17 humana (también llamado IL-17A) y con el uso de tales anticuerpos en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por la IL-17.

IL-17, una citoquina derivada de célula T presente por ejemplo en artritis reumatoide (RA), actúa como una citoquina pro-inflamatoria, particularmente en conjunto con IL-1 y TNF- $\alpha$  (Chabaud M & Miossec P (1999) *Arthritis Rheum* 42, 963-970; Awane M et al (1999) *J. Immunol* 162, 5337-5344). La IL-17 induce la producción de MMP y regula por disminución el TIMP (Jovanovic DV et al (2001) *J. Rheumatol.* 28, 712-718), y el bloqueo de IL-1 e IL-17 tiene un efecto sinérgico en la inflamación y la destrucción ósea in vivo (Chabaud M & Miossec (2001) *Arthritis Rheum* 44, 1293-1303). La producción excesiva o inapropiada de IL-17 se asocia con la patología de varias enfermedades y trastornos, tal como artritis reumatoide (Witowski et al., 2004 *Cell Mol Life Sci* 61:567-579), osteoartritis, aflojamiento de los implantes óseos, rechazo agudo de trasplante (Antonysamy et al., 1999, *J Immunol* 162, 577-584; van Kooten et al., 1998, *J Am Soc Nephrol* 9, 1526-1534), septicemia, choque endotóxico o séptico, alergias, asma (Molet et al., 2001, *J Allergy Clin Immunol* 108, 430-438), pérdida ósea, soriasis (Teunissen et al., 1998, *J Invest Dermatol* 111, 645-649), isquemia, esclerosis sistémica (Kurasawa et al., 2000, *Arthritis Rheum* 43, 2455-2463), apoplejía, y otros trastornos inflamatorios. Se han propuesto anticuerpos para la IL-17 para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por la IL-17; véase por ejemplo, WO 95/18826 y la discusión en la introducción de los mismos.

Ahora se preparan anticuerpos mejorados a la IL-17 humana aptos para uso en el tratamiento de artritis inflamatoria mediada por la IL-17. La invención también proporciona una molécula de unión a IL-17 para su uso en el tratamiento de la artritis inflamatoria que comprende los dominios variables de cadena ligera (V<sub>L</sub>) y de cadena pesada (V<sub>H</sub>); dicha molécula de unión de IL-17 comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V<sub>H</sub>) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, dicho CDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, dicho CDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y dicho CDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o equivalentes CDR directos de los mismos; y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V<sub>L</sub>) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', dicho CDR1' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, dicho CDR2' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y dicho CDR3' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 o los equivalentes CDR directos de los mismos.

La invención también proporciona una molécula de unión de IL-17 para uso en el tratamiento de artritis inflamatoria que comprende los dominios variables de cadena ligera (V<sub>L</sub>) y de cadena pesada (V<sub>H</sub>); dicha molécula de unión de IL-17 comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V<sub>H</sub>) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, dicho CDR1-x que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11, dicho CDR2-x tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12, y dicho CDR3-x tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 o los equivalentes CDR-x directos de los mismos; y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V<sub>L</sub>) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', dicho CDR1' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, dicho CDR2' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y dicho CDR3' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 o los equivalentes CDR' directos de los mismos.

A menos que se indique otra cosa, se describe aquí cualquier cadena de polipéptidos que tiene una secuencia de aminoácidos que parte en la extremidad del terminal N y que finaliza en la extremidad del terminal C. Cuando el sitio de unión a antígeno comprende los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, estos se pueden ubicar en la misma molécula de polipéptidos, preferiblemente, cada dominio puede estar en una cadena diferente, el dominio V<sub>H</sub> es parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma y el V<sub>L</sub> es parte de una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma.

"Molécula de unión de IL-17" significa cualquier molécula capaz de unirse al antígeno IL-17 sola o asociada con otras moléculas. La reacción de unión se puede mostrar mediante métodos estándar (ensayos cualitativos) que incluyen, por ejemplo, un ensayo de unión, ensayo de competición o un bioensayo para determinar la inhibición de la unión de IL-17 a su receptor o cualquier clase de ensayo de unión, con referencia a una prueba de control negativa en la que se utiliza un anticuerpo de especificidad no relacionada pero del mismo isotipo, por ejemplo un anticuerpo anti-CD25 (véase también Ejemplo 1).

Ejemplos de moléculas de unión a antígeno incluyen anticuerpos producidos por células B o hibridomas y anticuerpos humanos, de CDR injertados o quiméricos o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y Fab, así como también anticuerpos de dominio único o de cadena sencilla.

Un anticuerpo de cadena sencilla consiste de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo unido covalentemente mediante un ligador de péptido que consiste usualmente de 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente de 15 a 25 aminoácidos. Por lo tanto, tal una estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesada y ligera y se considera que el separador pequeño de péptidos debe ser menos antigénico que una parte constante completa. "Anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en el que las regiones constantes de cadenas pesada y ligera o ambas son de origen humano mientras que los dominios variables de las cadenas pesada y ligera son de origen no humano (por ejemplo de murino) o de origen humano pero derivado de un anticuerpo humano diferente. "Anticuerpo injertado en CDR" significa un anticuerpo en el que las regiones hipervariables (CDR) se derivan de un anticuerpo donante, tal como un anticuerpo no humano (por ejemplo de murino) o un anticuerpo humano diferente, mientras que todas o sustancialmente todas las otras partes de la inmunoglobulina por ejemplo las regiones constantes y las partes altamente conservadas de los dominios variables, es decir las regiones estructurales, se derivan de un anticuerpo receptor, por ejemplo un anticuerpo de origen humano. Sin embargo un anticuerpo injertado a CDR puede contener unos pocos aminoácidos de la secuencia donante en las regiones estructurales, por ejemplo en las partes de las regiones estructurales adyacentes a las regiones hipervariables. "Anticuerpo humano" significa un anticuerpo en el que las regiones constantes y variables de las cadenas pesada y ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo e incluye los anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de la parte constante y variable de inmunoglobulina de murino se han reemplazado por sus contrapartes humanas, por ejemplo como se describe en términos generales en la EP 0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 438474 B1 y EP 0 463151 B1.

Las moléculas de unión de IL-17 particularmente preferidas de la invención son anticuerpos humanos, especialmente el anticuerpo AIN457 como se describe aquí adelante en los Ejemplos 1 y 2.

Así en los anticuerpos quiméricos preferidos los dominios variables de las cadenas pesada y ligera son de origen humano, por ejemplo aquellos del anticuerpo AIN457 que se muestran en la SEQ ID NO: 10 (= dominio variable de cadena ligera, es decir el aminoácido 1 a 109 de la SEQ ID NO: 10) y SEQ ID NO: 8 (= dominio variable de cadena pesada, es decir el aminoácido 1 a 127 de la SEQ ID NO: 8). Los dominios de región constante también comprenden preferiblemente dominios de región constante humana adecuados, por ejemplo como se describe en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat E.A. et al, US Department of Health y Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.

Las regiones hipervariables se pueden asociar con cualquier clase de regiones estructurales, aunque preferiblemente son de origen humano. Las regiones estructurales adecuadas se describen en Kabat E.A. et al, *ibid*. La estructura de cadena pesada preferida es una estructura de cadena pesada humana, por ejemplo aquel del anticuerpo AIN457. Este consiste de la secuencia por ejemplo de las regiones FR1 (aminoácido 1 a 30 de la SEQ ID NO: 8), FR2 (aminoácido 36 a 49 de la SEQ ID NO: 8), FR3 (aminoácido 67 a 98 de la SEQ ID NO: 8) y FR4 (aminoácido 117 a 127 de la SEQ ID NO: 8). Tomando en consideración las regiones hipervariables determinadas de AIN457 mediante análisis de rayos X, otra estructura de cadena pesada preferido consiste en la secuencia de las regiones FR1-x (aminoácido 1 a 25 de la SEQ ID NO: 8), FR2-x (aminoácido 36 a 49 de la SEQ ID NO: 8), FR3-x (aminoácido 61 a 95 de la SEQ ID NO: 8) y FR4 (aminoácido 119 a 127 de la SEQ ID NO: 8). En una forma similar, la estructura de cadena ligera consiste, en la secuencia, de las regiones FR1' (aminoácido 1 a 23 de la SEQ ID NO: 10), FR2' (aminoácido 36 a 50 de la SEQ ID NO: 10), FR3' (aminoácido 58 a 89 de la SEQ ID NO: 10) y FR4' (aminoácido 99 a 109 de la SEQ ID NO: 10).

De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona una molécula de unión de IL-17 para uso en el tratamiento de artritis inflamatoria que comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que comprende un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a aquella mostrada en SEQ ID NO: 8 que inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 127 o un primer dominio como se describió anteriormente y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a aquella mostrada en SEQ ID NO: 10, que inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 109.

Los anticuerpos monoclonales que surgen contra una proteína encontrada en forma natural en todos los humanos se desarrollan típicamente en un sistema no humano por ejemplo en ratones, y como tales son proteínas típicamente no humanas. Como una consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico producido por un hibridoma, cuando se administra a los humanos, provoca una respuesta inmune indeseable que está mediada predominantemente por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto claramente limita el uso de tales anticuerpos ya que ellos no se pueden administrar durante un periodo prolongado. Por lo tanto se prefiere utilizar particularmente anticuerpos humanos de cadena sencilla, de dominio único, quiméricos, o injertados en CDR, o especialmente anticuerpos humanos que probablemente no provocan una respuesta alógena sustancial cuando se administran a los humanos.

En vista de lo anterior, se selecciona una molécula de unión de IL-17 más preferida para uso en el tratamiento de artritis inflamatoria a partir de un anticuerpo anti IL-17 humano que comprende por lo menos

- 5 a) una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 o equivalentes CDR directos de las mismas y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana; dicho CDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, dicho CDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y dicho CDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3; y
- 10 b) una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables y opcionalmente también las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3' o los equivalentes CDR directos de las mismas y (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana, dicho CDR1' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, dicho CDR2' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y dicho CDR3' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.
- Alternativamente, una molécula de unión de IL-17 para uso en el tratamiento de artritis inflamatoria se puede seleccionar de una molécula de unión de cadena sencilla que comprende un sitio de unión a antígeno que comprende
- 15 a) un primer dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 o equivalentes CDR directos de las mismas, dicho CDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, dicho CDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y dicho CDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3; y
- b) un segundo dominio que comprende las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3' o los equivalentes CDR directos de las mismas, dicho CDR1' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, dicho CDR2' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y dicho CDR3' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6; y
- 20 c) un ligador de péptido que se une a la extremidad de terminal N del primer dominio y a la extremidad de terminal C del segundo dominio o a la extremidad de terminal C del primer dominio y a la extremidad de terminal N del segundo dominio.
- Como es bien sabido, los cambios menores en una secuencia de aminoácido tal como eliminación, adición o sustitución de uno, unos pocos o aún varios aminoácidos puede conducir a una forma alélica de la proteína original que tiene propiedades sustancialmente idénticas.
- 25 Así, el término "equivalentes CDR directos de los mismos" significa moléculas de unión de IL-17 que comprenden en secuencia las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, y CDR3<sub>i</sub>, (en lugar de CDR1, CDR2, y CDR3), en donde
- (i) la región hipervariable CDR1<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO: 1; y
- 30 (ii) la región hipervariable CDR2<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO: 2; y
- (iii) la región hipervariable CDR3<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 3; y
- 35 (iv) tal una molécula que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, y CDR3<sub>i</sub> es capaz de inhibir la actividad de la IL-7 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.
- De forma similar, el término "equivalentes CDR-x directos de los mismos" significa moléculas de unión de IL-17 que comprenden en secuencia las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, y CDR3<sub>i-x</sub>, (en lugar de CDR1-x, CDR2-x, y CDR3-x), en donde
- 40 (v) la región hipervariable CDR1<sub>i-x</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable CDR1-x como se muestra en la SEQ ID NO: 11; y
- (vi) la región hipervariable CDR2<sub>i-x</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable CDR2-x como se muestra en la SEQ ID NO: 12; y
- 45 (vii) la región hipervariable CDR3<sub>i-x</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable CDR3-x como se muestra en la SEQ ID NO: 13; y
- (viii) tal una molécula que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, y CDR3<sub>i-x</sub> es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.
- 50 De forma similar, el término "equivalentes CDR' directos de los mismos" significa un dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1'<sub>i</sub>, CDR2'<sub>i</sub>, y CDR3'<sub>i</sub>, en donde

(i) la región hipervariable CDR1'i difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable CDR1' como se muestra en la SEQ ID NO: 4; y

(ii) la región hipervariable CDR2'i difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable CDR2' como se muestra en la SEQ ID NO: 5; y

5 (iii) la región hipervariable CDR3'i difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable CDR3' como se muestra en la SEQ ID NO: 6; y

(iv) tal una molécula que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1'i, CDR2'i, y CDR3'i es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

Alternativamente, una molécula de unión de IL-17 puede ser una molécula de unión de IL-17 que comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que comprende por lo menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V<sub>H</sub>) que comprende en la secuencia

a) regiones hipervariables CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2) y CDR3 (SEQ ID NO: 3); o

15 b) regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, CDR3<sub>i</sub>, dicha región hipervariable CDR1<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO: 1, dicha región hipervariable CDR2<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO: 2; y dicha región hipervariable CDR3<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 3; y

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

25 De forma similar, una molécula de unión de IL-17 para uso en el tratamiento de artritis inflamatoria puede ser una molécula de unión de IL-17 que comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que comprende por lo menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V<sub>H</sub>) que comprende en secuencia

a) regiones hipervariables CDR1-x (SEQ ID NO: 11), CDR2-x (SEQ ID NO: 12) y CDR3-x (SEQ ID NO: 13); o

30 b) regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, CDR3<sub>i-x</sub>, dicha región hipervariable CDR1<sub>i-x</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR1-x como se muestra en la SEQ ID NO: 11, dicha región hipervariable CDR2<sub>i-x</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR2-x como se muestra en la SEQ ID NO: 12; y dicha región hipervariable CDR3<sub>i-x</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR3-x como se muestra en la SEQ ID NO: 13; y dicha molécula de unión de IL-17 que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, y CDR3<sub>i-x</sub> es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

40 De forma similar, una molécula de unión de IL-17 para uso en el tratamiento de artritis inflamatoria puede ser una molécula de unión de IL-17 que comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que comprende por lo menos un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V<sub>L</sub>) que comprende en secuencia

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

45 b) regiones hipervariables CDR1'i, CDR2'i, CDR3'i, dicha región hipervariable CDR'1i difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR'1 como se muestra en la SEQ ID NO: 4, dicha región hipervariable CDR'2i difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR'2 como se muestra en la SEQ ID NO: 5; y dicha región hipervariable CDR'3i difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR'3 como se muestra en la SEQ ID NO: 6; y dicha molécula de unión de IL-17 comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR'1i, CDR'2i, y CDR'3i es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

50 Alternativamente, una molécula de unión de IL-17 para uso en el tratamiento de artritis inflamatoria puede ser una molécula de unión de IL-17 que comprende los dominios variables de cadena ligera (V<sub>L</sub>) y de cadena pesada (V<sub>H</sub>) y dicha molécula de unión de IL-17 comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que comprende:

## ES 2 677 245 T3

- a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2) y CDR3 (SEQ ID NO: 3); y un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1' (SEQ ID NO: 4), CDR2' (SEQ ID NO: 5) y CDR3' (SEQ ID NO: 6); o
- 5 b) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, y CDR3<sub>i</sub>, dicha región hipervariable de las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, CDR3<sub>i</sub>, dicha región hipervariable CDR1<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO: 1, dicha región hipervariable CDR2<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido (s) de la región hipervariable de CDR2 como se muestra en la
- 10 SEQ ID NO: 2; y dicha región hipervariable CDR3<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 3; y
- un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1'<sub>i</sub>, CDR2'<sub>i</sub>, CDR3'<sub>i</sub>, dicha región hipervariable CDR1'<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR'1 como se muestra en la SEQ ID NO: 4, dicha
- 15 región hipervariable CDR'2<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR'2 como se muestra en la SEQ ID NO: 5; y dicha región hipervariable CDR'3<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR'3 como se muestra en la SEQ ID NO: 6; y
- dicha molécula de unión de IL-17 definida en b) comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, CDR3<sub>i</sub>, CDR'1<sub>i</sub>, CDR'2<sub>i</sub>, y CDR'3<sub>i</sub> es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1nM (= 30 ng/ml) en una
- 20 concentración de 50 nM, preferiblemente 20nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.
- Alternativamente, una molécula de unión de IL-17 para uso en el tratamiento de artritis inflamatoria puede ser una
- 25 molécula de unión de IL-17 que comprende los dominios variables de cadena ligera ( $V_L$ ) y de cadena pesada ( $V_H$ ) y dicha molécula de unión de IL-17 comprende por lo menos un sitio de unión a antígeno que comprende:
- a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1-x (SEQ ID NO: 11), CDR2-x (SEQ ID NO: 12) y CDR3-x (SEQ ID NO: 13); y un dominio
- 30 variable de cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1' (SEQ ID NO: 4), CDR2' (SEQ ID NO: 5) y CDR3' (SEQ ID NO: 6); o
- b) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina ( $V_H$ ) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, y CDR3<sub>i-x</sub>, dicha región hipervariable de las regiones hipervariables CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub>, CDR3<sub>i-x</sub>, dicha región hipervariable CDR1<sub>i-x</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1
- 35 aminoácido de la región hipervariable de CDR1-x como se muestra en la SEQ ID NO: 11, dicha región hipervariable CDR2<sub>i-x</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR2-x como se muestra en la SEQ ID NO: 12; y dicha región hipervariable CDR3<sub>i-x</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR3-x como se muestra en la SEQ ID NO: 13; y
- un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina ( $V_L$ ) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1'<sub>i</sub>, CDR2'<sub>i</sub>, CDR3'<sub>i</sub>, dicha región hipervariable CDR'1<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más
- 40 preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR'1 como se muestra en la SEQ ID NO: 4, dicha región hipervariable CDR'2<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR'2 como se muestra en la SEQ ID NO: 5; y dicha región hipervariable CDR'3<sub>i</sub> difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido de la región hipervariable de CDR'3 como se muestra en la SEQ ID NO: 6; y
- dicha molécula de unión de IL-17 definida en b) comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub>, CDR3<sub>i</sub>, CDR'1<sub>i</sub>, CDR'2<sub>i</sub>, y CDR'3<sub>i</sub> es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1nM (= 30 ng/ml) en una
- 45 concentración de 50 nM, preferiblemente 20nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.
- 50 El anticuerpo de unión de IL-17 o fragmento del mismo para uso en el tratamiento de la artritis inflamatoria es un anticuerpo IgG1/K humano que comprende:
- (a) una cadena ligera que consiste en los residuos de aminoácidos que comienzan en el residuo +1 de la Tabla 10

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

y

(b) una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácidos que comienzan en el residuo +1 en la Tabla 11

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

5 La inhibición de la unión de IL-17 a su receptor se puede probar de forma conveniente en varios ensayos que incluyen tales ensayos que se describen aquí adelante en el texto. El término "al mismo grado" significa aquella referencia y las moléculas equivalentes exhiben, sobre una base estadística, actividad de inhibición IL-17 esencialmente idéntica en uno de los ensayos referidos aquí (véase Ejemplo 1). Por ejemplo, las moléculas de unión de IL-17 de la invención tienen típicamente IC<sub>50</sub> para la inhibición de la IL-17 humana en la producción de IL-6  
 10 inducida por la IL-17 humana en fibroblastos de dermis humana que están dentro de +/- x5, es decir por debajo de 10 nM, más preferiblemente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 nM de aquellos de, preferiblemente sustancialmente los mismos que, el IC<sub>50</sub> de la molécula de referencia correspondiente cuando se ensayan como se describe en el Ejemplo 1.

15 Alternativamente, el ensayo utilizado puede ser un ensayo de inhibición competitiva de la unión de IL-17 mediante receptores IL-17 solubles (por ejemplo las construcciones R/Fc de la IL-17 humana del Ejemplo 1) y la molécula de unión de IL-17 de la invención.

Más preferiblemente, el anticuerpo IL-17 humana comprende por lo menos

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

25 La parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3,  $\gamma$ 4,  $\mu$ ,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\delta$  o  $\epsilon$ , preferiblemente del tipo  $\gamma$ , más preferiblemente del tipo  $\gamma$ 1, mientras que la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo  $\kappa$  o  $\lambda$  (que incluye los subtipos  $\lambda$ 1,  $\lambda$ 2 y  $\lambda$ 3) pero es preferiblemente del tipo  $\kappa$ . Las secuencias de aminoácidos de todas estas partes constantes se dan en Kabat et al (supra).

Los conjugados de las moléculas de unión de la invención, por ejemplo conjugados de enzima o toxina o radioisótopo, también se incluyen dentro del alcance de la invención.

"Polipéptido", si no se especifica aquí de otra forma, incluye cualquier péptido o proteína que comprende los aminoácidos unidos uno al otro mediante enlaces de péptidos, que tienen una secuencia de aminoácidos que inician de la extremidad del terminal N y terminan en la extremidad del terminal C. Preferiblemente el polipéptido de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, se prefiere más un anticuerpo monoclonal quimérico (también llamado injertado en V) o humanizado (también llamado injertado en CDR), más preferido un anticuerpo completamente humano que se puede obtener por ejemplo mediante la tecnología ilustrada en el Ejemplo 1. El anticuerpo monoclonal completamente humano o humanizado (injertado en CDR) puede o no puede incluir las mutaciones adicionales introducidas en las secuencias estructurales (FR) del anticuerpo receptor.

Un derivado funcional de un polipéptido como se utiliza aquí incluye una molécula que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un polipéptido para la presente invención, es decir que tiene la capacidad de unirse a la IL-17 humana. Un derivado funcional incluye fragmentos y análogos de péptidos de un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Los fragmentos comprenden regiones dentro de la secuencia de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica. El término "derivado" se utiliza para definir las variantes de la secuencia de aminoácido, y las modificaciones covalentes de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica. Los derivados funcionales de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica, por ejemplo de la región hipervariable de la cadena ligera y pesada, tienen preferiblemente por lo menos aproximadamente 65%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 75%, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 85%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95, 96, 97, 98, 99% de homología de secuencia general con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica, y retiene sustancialmente la capacidad de unirse a la IL-17 humana o por ejemplo neutraliza la producción de IL-6 de los fibroblastos de dermis humana inducidos por IL-17.

El término "modificación covalente" incluye modificaciones de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica; o un fragmento de la misma con un agente de derivación proteínico o no proteínico orgánico, fusiones a las secuencias de polipéptido heterólogo, y modificaciones post-traduccionales. Los polipéptidos modificados covalentemente, por ejemplo de una secuencia específica, aún tienen la capacidad de unirse a la IL-17 humana o por ejemplo neutraliza la producción de IL-6 de los fibroblastos de dermis humana inducidos por IL-17 mediante entrecruzamiento. Las modificaciones covalentes se introducen tradicionalmente al hacer reaccionar los residuos de aminoácido dirigidos con un agente de derivación orgánico que es capaz de hacer reaccionar con los lados seleccionados o los residuos terminales, o mediante mecanismos de aprovechamiento de las modificaciones post-traduccionales que funcionan en las células anfitrionas recombinantes seleccionadas. Ciertas modificaciones post-traduccionales son el resultado de la acción de las células anfitrionas recombinantes en el polipéptido expresado. Los residuos glutamilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados post-traduccionalmente en los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes. Alternativamente, estos residuos se desaminan bajo condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones post-traduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de los residuos serilo, tirosina o treonilo, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales lisina, arginina, e histidina, véase por ejemplo T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983). Las modificaciones covalentes incluyen por ejemplo proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica y sus variantes de secuencia de aminoácido, tal como inmunoadhesinas, y fusiones del terminal N para las secuencias de señal heterólogas.

"Homología" con respecto a un polipéptido nativo y su derivado funcional se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para alcanzar el porcentaje de homología máximo, y no considerar cualesquier sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones de terminal N- o C ni las inserciones se deben interpretar como reducción en la homología o identidad. Son bien conocidos métodos y programas de ordenador para alineación.

"Aminoácidos", se refiere a todos los aminoácidos L- $\alpha$  que se presentan en forma natural, por ejemplo y que incluyen los aminoácidos D. Los aminoácidos se identifican por sus designaciones bien conocidas de una letra o tres letras.

El término "variante de secuencia de aminoácido" se refiere a moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos cuando se compara con un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica. Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica, aún tienen la capacidad de unirse a la IL-17 humana o por ejemplo neutraliza la producción de IL-6 de los fibroblastos de dermis humana inducidos por IL-17. Las variantes de sustitución son aquellas que tienen por lo menos un residuo de aminoácido eliminado y un aminoácido diferente insertado en su lugar en la misma posición en el polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica. Estas sustituciones pueden ser únicas, en donde solo ha sido sustituido un aminoácido en la molécula, o ellos pueden ser múltiples, en donde se han sustituido dos o más aminoácidos en la misma molécula. Las variantes de inserción son aquellas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado al grupo funcional  $\alpha$ -carboxi o



$\alpha$ -amino del aminoácido. Las variantes de eliminación son aquellas con uno o más aminoácidos en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia específica, retirada. De forma común, las variantes de eliminación tendrán uno o dos aminoácidos eliminados en una región particular de la molécula.

5 Una molécula de unión de IL-17 para uso en el tratamiento de artritis se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. En vista de esto, se pueden construir una o más moléculas de ADN que codifican las moléculas de unión, colocadas bajo secuencias de control apropiadas y transferidas en un organismo anfitrión adecuado para expresión.

En una forma muy general, de acuerdo con lo anterior se proporcionan

10 (i) moléculas de ADN que codifican una molécula de unión de IL-17 de dominio sencillo de la divulgación, una molécula de unión de IL-17 de cadena sencilla de la invención, una molécula de unión de IL-17 que comprende una cadena ligera y pesada como se define aquí, o fragmentos de una molécula de unión de IL-17 de la invención; y

(ii) el uso de las moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula de unión de IL-17 de la invención mediante medios recombinantes.

15 De acuerdo con lo anterior, la divulgación proporciona una molécula de ADN que codifica una molécula de unión de IL-17 como se describió anteriormente.

Adicionalmente, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.

20 Adicionalmente, la divulgación proporciona una construcción de ADN que comprende dos moléculas de ADN de las cuales una es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO: 7 o es un equivalente directo ADN<sub>H</sub> del mismo y la otra es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO: 9, o es un equivalente ADN<sub>L</sub> directo del mismo.

25 El estado actual de la técnica es tal que el trabajador experto es capaz de sintetizar las moléculas de ADN de la invención dada la información proporcionada aquí es decir las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables y las secuencias de ADN que las codifican. Un método para construir un gen de dominio variable se describe por ejemplo en la EPA 239 400 y se puede resumir brevemente como sigue: se clona un gen que codifica un dominio variable de un MAb de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifican la estructura y las regiones hipervariables y se retiran los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables de tal manera que se fusionan los segmentos de ADN que codifican las regiones estructurales junto con los sitios de restricción adecuados en las uniones. Los sitios de restricción se pueden generar en las posiciones apropiadas mediante mutagenia de la molécula de ADN mediante procedimientos estándar. Los casetes de CDR sintéticos de doble hebra se preparan mediante síntesis de ADN de acuerdo con las secuencias que codifican la SEQ ID NO: 1 (CDR1), SEQ ID NO: 2 (CDR2), SEQ ID NO: 3 (CDR3), SEQ ID NO: 4 (CDR1'), SEQ ID NO: 5 (CDR2'), SEQ ID NO: 6 (CDR6'), SEQ ID NO: 11 (CDR1-x), SEQ ID NO: 12 (CDR2-x), SEQ ID NO: 13 (CDR3-x). Estos casetes se proporcionan con extremos pegajosos ya que ellos se pueden ligar en las uniones del soporte.

35 Adicionalmente, no es necesario tener acceso al mRNA de una producción de estirpes de células de hibridoma con el fin de obtener una construcción de ADN que codifica las moléculas de unión de IL-17 de la invención. Así la solicitud PCT WO 90/07861 da instrucciones completas para la producción de un anticuerpo mediante técnicas de ADN recombinantes dada solo la información escrita como la secuencia de nucleótido del gen. El método comprende la síntesis de un número de los oligonucleótidos, su amplificación mediante el método PCR, y su empalme para dar la secuencia de ADN deseada.

40 Los vectores de expresión que comprenden un promotor adecuado o genes que codifican partes constantes de cadena ligera y pesada están públicamente disponibles. Así, una vez se prepara una molécula de ADN de la invención esta se puede transferir de manera conveniente a un vector de expresión apropiado. Las moléculas de ADN que codifican los anticuerpos de cadena sencilla también se pueden preparar mediante métodos estándar, por ejemplo, como se describe en la WO 88/1649.

45 En analogía al caso de los equivalentes CDR, el término "equivalentes ADN<sub>H</sub> directos de los mismos" significa que representa una primera construcción de ADN que codifica una cadena pesada o fragmento de la misma de una molécula de unión de IL-17 de la invención y comprende:

50 a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente la estructura y las regiones hipervariables, dichas regiones hipervariables están en la secuencia CDR1<sub>i</sub>, CDR2<sub>i</sub> y CDR3<sub>i</sub>, dicho CDR1<sub>i</sub> es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO: 1, dicho CDR2<sub>i</sub> es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO: 2, y CDR3<sub>i</sub> es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 3; esta primera parte

empieza en un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y termina con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y

5 b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de parada; y

c) dicha construcción de ADN que codifica un polipéptido que es capaz solo o en combinación con otro polipéptido de inhibir la actividad de la IL-7 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

10 De forma similar, el término "equivalentes ADN<sub>H-x</sub> directos de los mismos" significa que representa en una primera construcción de ADN alternativa que codifica una cadena pesada o fragmento de la misma de una molécula de unión de IL-17 de la invención y comprende:

15 a) una primera parte que codifica un dominio variable comprende alternativamente la estructura y las regiones hipervariables, dichas regiones hipervariables están en la secuencia CDR1<sub>i-x</sub>, CDR2<sub>i-x</sub> y CDR3<sub>i-x</sub>, dicho CDR1<sub>i-x</sub> es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO: 11, dicho CDR2<sub>i-x</sub> es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO: 12, y CDR3<sub>i-x</sub> es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 13; esta primera parte empieza en un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y termina con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y

25 b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo, seguido por un codón de parada; y

c) Dicha construcción de ADN que codifica un polipéptido que es capaz solo o en combinación con otro polipéptido de inhibir la actividad de la IL-7 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

30 Preferiblemente, estas construcciones de ADN codifican un dominio variable que comprende alternativamente la estructura y las regiones hipervariables, dichas regiones hipervariables están en la secuencia CDR1, CDR2 y CDR3, dicho CDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, dicho CDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y dicho CDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3. Más preferiblemente, estas construcciones de ADN codifican un dominio variable que comprende alternativamente la estructura y las regiones hipervariables, dichas regiones hipervariables están en la secuencia CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, dicho CDR1-x que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11, dicho CDR2-x tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12, y dicho CDR3-x tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13. Más preferiblemente, esta primera parte codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 8 que inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 127. Más preferiblemente la primera parte tiene la secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 7 partiendo con el nucleótido en la posición 1 y finalizando con el nucleótido en la posición 381. También preferiblemente, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena pesada humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena humana  $\gamma$ 1. Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico (que comprende intrones) o un fragmento de cADN (sin intrones).

45 De forma similar, el término "equivalentes directos de ADN<sub>L</sub> de los mismos" significa que representa para una segunda construcción de ADN que codifica una cadena ligera o fragmento de la misma de una molécula de unión de IL-17 de la invención y comprende:

50 a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente la estructura y regiones hipervariables; dichas regiones hipervariables son CDR3'<sub>i</sub> y opcionalmente CDR1'<sub>i</sub> y CDR2'<sub>i</sub>, dicho CDR1'<sub>i</sub> es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR1' como se muestra en la SEQ ID NO: 4, dicho CDR2'<sub>i</sub> es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR2' como se muestra en la SEQ ID NO: 5, y dicho CDR3'<sub>i</sub> es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR3' como se muestra en la SEQ ID NO: 6; esta primera parte empieza en un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y termina con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y

b) una segunda parte que codifica la parte constante de la cadena ligera o fragmento del mismo que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo seguido por un codón de parada; y

5 c) dicha construcción de ADN que codifica un polipéptido que es capaz solo o en combinación con otro polipéptido de inhibir la actividad de la IL-7 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

10 Preferiblemente, esta segunda construcción de ADN codifica un dominio variable que comprende alternativamente la estructura y regiones hipervariables, dichas regiones hipervariables están en la secuencia CDR1', CDR2' y CDR3', dicho CDR1' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, dicho CDR2' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, y dicho CDR3' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6. Más preferiblemente, esta primera parte de la segunda construcción de ADN codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10 que inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 109. Más preferiblemente, la primera parte  
15 tiene la secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 9 partiendo con el nucleótido en la posición 1 y finalizando con el nucleótido en la posición 327. También preferiblemente la segunda parte codifica la parte constante de una cadena ligera humana, más preferiblemente la parte constante de la  $\kappa$  humana.

Preferiblemente, se utilizarán la primera y segunda construcción de ADN, pero también se pueden utilizar por separado.

20 La invención también incluye las moléculas de unión de IL-17 en las que uno o más de los residuos de aminoácido de CDR1, CDR2, CDR3, CDR1-x, CDR2-x, CDR3-x, CDR1', CDR2' o CDR3' o los soportes, típicamente solo unos pocos (por ejemplo 1-4), se cambian; por ejemplo mediante mutación por ejemplo mutagenia dirigida a sitio de las secuencias de ADN correspondientes. La invención incluye las secuencias de ADN que codifican tales moléculas de unión de IL-17 cambiadas. En particular la invención incluye las moléculas de unión a IL-17 en las que uno o más  
25 residuos de CDR1' o CDR2' se han cambiado de los residuos mostrados en la SEQ ID NO: 4 (para CDR1') y SEQ ID NO: 5 (para CDR2').

En la primera y segunda construcciones de ADN, la primera y segunda partes se pueden separar mediante un intrón, y, un mejorador se puede ubicar de forma conveniente en el intrón entre la primera y segunda partes. La presencia de tal un mejorador que se transcribe pero no se traduce, puede ayudar a la transcripción eficiente. En realizaciones particulares la primera y la segunda construcciones de ADN comprenden el mejorador de un gen de  
30 cadena pesada ventajosamente de origen humano.

Cada una de las construcciones de ADN se pone bajo el control de las secuencias de control adecuadas, en particular bajo el control de un promotor adecuado. Se puede utilizar cualquier clase de promotor, dado que este se adapta al organismo anfitrión en el que se transferirán las construcciones de ADN para expresión.

35 El anticuerpo deseado se puede producir en un cultivo celular o en un animal transgénico. Se puede obtener un animal transgénico adecuado de acuerdo con métodos estándar que incluyen microinyectar en los huevos la primera y la segunda construcciones de ADN puestas bajo las secuencias de control adecuadas que transfieren los huevos así preparados en las hembras seudopreñadas y seleccionar un descendiente que expresa el anticuerpo deseado.

40 Cuando se producen cadenas de anticuerpo en un cultivo celular, las construcciones de ADN primero se pueden insertar en un único vector de expresión o en dos vectores de expresión separados pero compatibles, el último siendo posiblemente preferido.

De acuerdo con lo anterior, la invención también proporciona un vector de expresión capaz de replicación en una estirpe celular procariótica o eucariótica que comprende por lo menos una de las construcciones de ADN descritas anteriormente.

45 Cada vector de expresión que contiene una construcción de ADN luego se transfiere a un organismo anfitrión adecuado. Cuando las construcciones de ADN se insertan de forma separada en dos vectores de expresión, se pueden transferir de forma separada, es decir un tipo de vector por célula, o se co-transfieren, se prefiere esta última posibilidad. Un organismo anfitrión adecuado puede ser una bacteria, una levadura o una estirpe celular de mamífero, se prefiere esta última. Más preferiblemente, la estirpe celular de mamífero es de origen linfóide, por  
50 ejemplo un mieloma, hibridoma o una célula B inmortalizada normal, que no expresa de manera conveniente ningún anticuerpo endógeno de cadena ligera o pesada.

Para la expresión en células de mamífero se prefiere que la secuencia codificante de la molécula de unión de IL-17 se integre en el ADN de la célula anfitriona dentro de un locus que permite o favorece un alto nivel de expresión de la molécula de unión de IL-17. Las células en las que la molécula de unión de IL-17 codifica las secuencias que se integran en tal locus favorable se pueden identificar y seleccionar sobre la base de los niveles de la molécula de  
55 unión de IL-17 que ellos expresan. Se puede utilizar cualquier marcador seleccionable adecuado para la preparación

de las células anfitrionas que contienen la secuencia que codifica la molécula de unión de IL-17; por ejemplo, un gen dhfr /metotrexato o se puede utilizar el sistema de selección equivalente. Los sistemas alternativos para la expresión de las moléculas de unión de IL-17 de la invención incluyen sistemas de amplificación/selección basados en GS, tal como aquellos descritos en la EP 0256055 B, EP 0323997 B y la solicitud de patente Europea 89303964.4.

- 5 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un proceso para la producción de una molécula de unión de IL-17 que comprende (i) cultivar un organismo que se transforma con un vector de expresión como se definió anteriormente y (ii) recuperar la molécula de unión de IL-17 del cultivo.

10 Para los propósitos de la presente descripción un anticuerpo es "capaz de inhibir la unión de IL-17 como AIN457" si el anticuerpo es capaz de inhibir la unión de IL-17 a su receptor sustancialmente al mismo grado que el anticuerpo AIN457, en donde "al mismo grado" tiene el significado como se definió anteriormente.

15 El anticuerpo AIN457 tiene afinidad de unión al IL-17 que es mayor que las afinidades previamente reportadas para los anticuerpos anti- IL-17, en particular a cualesquier anticuerpos anti IL-17 humanas. Así el AIN457 tiene una constante de equilibrio de disociación KD para la unión a IL-17 de aproximadamente  $0.188 \pm 0.036$  nM (determinado por BIAcore, por ejemplo como se muestra en el Ejemplo 2). Esta alta afinidad de unión hace el anticuerpo AIN457 particularmente adecuado para aplicaciones terapéuticas.

En la presente descripción la frase "enfermedad mediada por IL-17" abarca todas las enfermedades y afecciones médicas en las que el IL-17 cumple una función, directamente o indirectamente, en la enfermedad o afección médica, que incluye el origen, desarrollo, progreso, persistencia o patología de la enfermedad o afección.

20 En la presente descripción los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren a tratamiento profiláctico o preventivo así como también tratamiento que modifica la enfermedad o tratamiento curativo, que incluye el tratamiento del paciente en riesgo de contraer la enfermedad o se sospecha de haber contraído la enfermedad así como también pacientes que están enfermos o que se han diagnosticado que sufren de una enfermedad o afección médica, e incluye supresión de la recaída clínica.

25 Las moléculas de unión de IL-17 como se definió anteriormente tienen especificidad de unión para la IL-17 humana, en particular anticuerpos que son capaces de inhibir la unión de IL-17 a su receptor; y anticuerpos para IL-17 que son capaces de inhibir la actividad de la IL-7 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula al 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana, se denominan aquí como los anticuerpos de la invención.

30 Preferiblemente los anticuerpos de la divulgación son anticuerpos humanos, más preferiblemente el anticuerpo AIN457 o los equivalentes directos de los mismos.

35 Los anticuerpos de la divulgación bloquean los efectos de IL-17 en sus células objetivo y de esta manera son indicados para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17. Estas y otras actividades farmacológicas de los anticuerpos de la invención se pueden demostrar en métodos de prueba estándar por ejemplo como se describe adelante:

Neutralización de la producción dependiente de IL-17 de interleuquina-6 mediante fibroblastos humanos primarios: La producción de IL-6 en fibroblastos primarios humanos (dérmicos) es dependiente de IL-17 (Hwang SY et al., (2004) Arthritis Res Ther; 6:R120-128.

40 En resumen, se estimulan fibroblastos de dermis humana con el IL-17 recombinante en la presencia de varias concentraciones del Anticuerpo de la invención o el receptor de la IL-17 humana con la parte Fc. El anticuerpo anti-CD25 quimérico Simulect® (basiliximab) se utiliza como un control negativo. El sobrenadante se toma después de 16 h de estimulación y se evalúa para IL-6 mediante ELISA. Los anticuerpos de la invención tienen típicamente IC<sub>50</sub> para la inhibición de la producción de IL-6 (en la presencia de la IL-17 humana 1nM) de aproximadamente 50 nM o menos (por ejemplo de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 nM) cuando se prueba como se hizo anteriormente, es decir dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana. Preferiblemente, los Anticuerpos de la invención tienen un IC<sub>50</sub> para la inhibición de la producción de IL-6 como se definió anteriormente de aproximadamente 20 nM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 10 nM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 5 nM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 1 nM o menos.

50 Como se indicó en el ensayo anterior los Anticuerpos de la invención bloquean potencialmente los efectos de IL-17. De acuerdo con lo anterior, los Anticuerpos de la invención tienen utilidad farmacéutica como sigue:

Los anticuerpos de la divulgación son útiles en la profilaxis y el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-17 o afecciones médicas, por ejemplo afecciones inflamatorias, alergias y afecciones alérgicas, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, infecciones severas, y rechazo de trasplante de tejido u órgano.

Por ejemplo, los Anticuerpos de la divulgación se pueden utilizar para el tratamiento de receptores de trasplantes de corazón, pulmón, trasplantes combinados de corazón-pulmón, hígado, riñón, trasplantes pancreáticos, trasplantes de piel o córnea, que incluyen rechazo de aloinjerto o rechazo de xenoinjerto, y para la prevención de enfermedad de injerto-versus-anfitrión, tal como luego de trasplante de médula ósea, y trasplante de órgano asociado a arteriosclerosis.

Los anticuerpos de la divulgación son particularmente útiles para el tratamiento, prevención, o alivio de enfermedad autoinmune y de afecciones inflamatorias, en particular afecciones inflamatorias con una etiología que incluye un componente autoinmune tal como artritis (por ejemplo artritis reumatoide, artritis crónica progrediente y artritis deformante) y enfermedades reumáticas, que incluyen afecciones inflamatorias y enfermedades reumáticas que involucran pérdida ósea, dolor inflamatorio, espondiloartropatías que incluyen espondililitis anquilosante, síndrome de Reiter, artritis reactiva, artritis sorriática, y artritis enteropática, hipersensibilidad (que incluye hipersensibilidad de las vías respiratorias e hipersensibilidad dérmica) y alergias. Las enfermedades auto-inmunes específicas para las que se pueden emplear los Anticuerpos de la invención incluyen trastornos hematológicos autoinmunes (que incluyen por ejemplo anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia de glóbulo rojo puro y trombocitopenia idiopática), lupus sistémico eritematoso, trastornos inflamatorios del músculo, policondritis, escleroderma, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis crónica activa, miastenia gravis, soriasis, síndrome de Steven-Johnson, sprúe idiopático, enfermedad autoinmune inflamatoria del intestino (que incluye por ejemplo colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y Síndrome de Intestino Irritable), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes mellitus tipo I), uveítis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis primaveril, fibrosis de pulmón intersticial, artritis sorriática y glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, por ejemplo que incluye síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambio mínimo), tumores, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria de la piel y cornea, miositis, aflojamiento de implantes óseos, trastornos metabólicos, tal como aterosclerosis, diabetes, y dislipidemia.

Los Anticuerpos de la divulgación también son útiles para el tratamiento, prevención, o alivio de asma, bronquitis, neumoconiosis, enfisema pulmonar, y otras enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias.

Los Anticuerpos de la divulgación son útiles para tratar reacciones inflamatorias hiperagudas y agudas indeseables que están mediadas por IL-17 o implican la producción de IL-17, o la promoción de TNF liberado por IL-17, por ejemplo infecciones agudas, por ejemplo choque septicémico (por ejemplo, choque endotóxico y síndrome de dificultad respiratoria de adultos), meningitis, neumonía; y quemaduras severas; y para el tratamiento de caquexia o síndrome consuntivo asociado con liberación TNF mórbida, a consecuencia de infección, cáncer, o disfunción de órgano, especialmente caquexia relacionada con el SIDA, por ejemplo, asociada con o a consecuencia de infección por VIH.

Los Anticuerpos de la divulgación son particularmente útiles para tratar enfermedades de metabolismo óseo que incluyen osteoartritis, osteoporosis y otras artritis inflamatorias, y pérdida ósea en general, que incluyen pérdida ósea relacionada con la edad, y en particular enfermedad periodóntica.

Para estas indicaciones, la dosificación apropiada, por supuesto, variará dependiendo de, por ejemplo, el Anticuerpo particular de la invención que se va a emplear, el anfitrión, el modo de administración y la naturaleza y severidad de la afección que se va a tratar. Sin embargo, en el uso profiláctico, se indican de manera general los resultados satisfactorios que van a obtener en dosificaciones de aproximadamente 0.05 mg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal, más usualmente de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal. La frecuencia de dosificación para usos profilácticos estará normalmente en el rango de aproximadamente una vez por semana hasta aproximadamente una vez cada 3 meses, más usualmente en el rango de aproximadamente una vez cada 2 semanas hasta aproximadamente una vez cada 10 semanas, por ejemplo una vez cada 4 a 8 semanas. El anticuerpo de la invención se administra de forma conveniente parenteralmente, intravenosamente, por ejemplo en la vena antecubital u otra vena periférica, intramuscularmente, o subcutáneamente. Un tratamiento profiláctico comprende típicamente administrar el Anticuerpo de la invención una vez por mes a una vez cada 2 a 3 meses, o menos frecuentemente.

Los Anticuerpos de la divulgación se pueden administrar como un único ingrediente activo o en conjunto con, por ejemplo como un adyuvante para o en combinación con, otros fármacos por ejemplo agentes inmunosupresores o agentes inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios, por ejemplo para el tratamiento o prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, los Anticuerpos de la invención se pueden utilizar en combinación con DMARD, por ejemplo sales de Gold, sulfasalazina, antimalarias, metotrexato, Dpenicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina, por ejemplo ciclosporina A o FK 506; un modulador de recirculación de linfocitos, por ejemplo FTY720 y análogos FTY720; un inhibidor mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxietyl)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene propiedades inmuno-supresoras, por ejemplo ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; mico-feno-lato mofetilo; 15-desoxiespergualina o un homólogo inmunosupresor, análogo o derivado de los mismos; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales para los receptores de leucocito, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula de unión recombinante que

5 tiene por lo menos una porción del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante de la misma, por ejemplo por lo menos una porción extracelular de CTLA4 o un mutante de la misma unida a una secuencia de proteína diferente a CTLA4, por ejemplo CTLA4Ig (por ejemplo la designada por ATCC 68629) o un mutante de la misma, por ejemplo LEA29Y; inhibidores de molécula de adhesión, por ejemplo antagonistas LFA-1, antagonistas ICAM-1 o -3, antagonistas VCAM-4 o antagonistas VLA-4; o un agente quimioterapéutico, por ejemplo paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, doxorubicina o 5-fluorouracilo; agentes anti TNF, por ejemplo anticuerpos monoclonales para TNF, por ejemplo infliximab, adalimumab, CDP870, o construcciones del receptor para TNF-RI o TNF-RII, por ejemplo Etanercept, PEG-TNF-RI; bloqueadores de las citoquinas proinflamatorias, bloqueadores de IL- 1, por ejemplo Anakinra o IL-1 trap, AAL160, ACZ 885, bloqueadores de IL-6; bloqueadores de quimioquinas, por ejemplo inhibidores o activadores de proteasas, por ejemplo metaloproteasas, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-CD20, NSAID, tal como aspirina o un agente anti-infeccioso (la lista no se limita a los agentes mencionados).

De acuerdo con lo anterior la presente divulgación proporciona en un aspecto aún adicional:

15 Un método como se definió anteriormente que comprende co-administración, por ejemplo concomitantemente o en secuencia, de una cantidad terapéuticamente afectiva de una molécula de unión de IL-17, por ejemplo un anticuerpo de la invención, y por lo menos una segunda sustancia de fármaco, dicha segunda sustancia de fármaco es un inmuno-supresor / inmunomodulador, quimioterapéutico anti-inflamatorio o fármaco anti-infeccioso, por ejemplo como se indicó anteriormente.

20 O, una combinación terapéutica, por ejemplo un equipo, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de a) una molécula de unión de IL-17, por ejemplo un anticuerpo de la invención, y b) por lo menos una segunda sustancia seleccionada de un inmuno-supresor / inmunomodulador, quimioterapéutico anti-inflamatorio o fármaco anti-infeccioso, por ejemplo como se indicó anteriormente. El equipo puede comprender instrucciones para su administración.

25 Cuando los Anticuerpos de la divulgación se administran en conjunto con otros inmuno-supresores / inmunomoduladores, quimioterapéuticos anti-inflamatorios o terapia anti-infecciosa, las dosificaciones del compuesto de combinación co-administrado variarán por supuesto dependiendo del tipo de co-fármaco empleado, por ejemplo si se trata de un DMARD, anti-TNF, bloqueador de IL-1 u otros, sobre el fármaco específico empleado, sobre la afección que trata, etc.

30 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden fabricar de manera convencional. Una composición de acuerdo con la divulgación se proporciona preferiblemente en forma liofilizada. Para la administración inmediata esta se disuelve en un portador acuoso adecuado, por ejemplo agua estéril para inyección o solución salina fisiológica regulada estéril. Si se considera deseable hacer una solución de mayor volumen para la administración mediante infusión como una inyección de bolo, es ventajoso incorporar albúmina de suero humano o la propia sangre heparinizada del paciente en la solución salina al momento de la formulación. Alternativamente, la formulación se aplica subcutáneamente. La presencia de un exceso de tal proteína fisiológicamente inerte evita la pérdida de anticuerpo mediante adsorción en las paredes del contenedor y la tubería utilizada con la solución de infusión. Si se utiliza albúmina, una concentración adecuada es de 0.5 a 4.5% en peso de la solución salina. Otras formulaciones comprenden formulación líquida o liofilizada.

La invención se describe adicionalmente por vía de ilustración en los siguientes Ejemplos.

#### 40 **Ejemplos**

Se utilizan ratones transgénicos hechos mediante ingeniería para expresar el repertorio IgG/k humano en lugar del repertorio de inmunoglobulina de murino (Fishwild et al., 1996, Nat Biotechnol., 14, 845-851) para generar los anticuerpos en la IL-17 humana. Las células B de estos ratones se immortalizan mediante tecnología de hibridoma estándar y se obtienen células de hibridoma de murino que secretan el anticuerpo AIN457 IgG1/k humano.

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

Producción de la IL-17 humana recombinante (hulL-17): La hulL-17 recombinante se produce en E. coli en cuerpos de inclusión y se repliega mediante técnicas convencionales (producción propia libre de portador (E. coli; Novartis Pharma, lote BME3141/ 98) o compradas (libre de portador, E. coli; R&D Systems #317-IL/CF)) o cuando se secreta y glucosila parcialmente la proteína en HEK.EBNA (hulL-17 recombinante, libre de portador (IL-17 APP-C6 de células HEK/EBNA transfectadas; Novartis Pharma, lote En.E-3382/82; 0.28 mg/ml; hulL-17 recombinante, libre de portador (IL-17 APP-C4 de células HEK/EBNA transfectadas; Novartis Pharma, lote En.E-3382/83; 0.29 mg/ml)). Esta última forma tiene una extensión de 4 aminoácidos en el terminal C para la purificación rápida de los sobrenadantes del cultivo mediante cromatografía de inmunoafinidad. En este caso, se cargan sobrenadantes de cultivo en una columna de tamaño apropiado de un anticuerpo anti-tag inmovilizado específico acoplado a Sefarosa 4B activada CNBr en una densidad de 10 mg/ml de resina siguiendo las instrucciones del fabricante (Farmacia). Después de lavado inicial con PBS, se eluye la hulL-17 unida con glicina a 100 mM, pH 2.7 y se neutraliza inmediatamente con NaOH diluido.

## ES 2 677 245 T3

- 5 Acoplamiento de hUL-17 a Hemocianina de Lapa Ojo de Cerradura (KLH): la hUL-17 producida en *E. coli* o HEK.EBNA se acopla al KLH pre-activado con un exceso del entrecruzador homobifuncional de Suberato de disuccinimidilo (DSS). En resumen, se reconstituyen 20 mg de Imject® Mariculture KLH liofilizado (Pierce # 77600) con 2 ml de H<sub>2</sub>O para dar una solución de 10 mg/ml que contiene Solución Salina Regulada con Fosfato (PBS), pH 7.2. A esta solución de 400 µl se agregan 250 mM de DSS en Sulfóxido de Dimetilo (DMSO) y la mezcla se agita durante aproximadamente 1 hr a temperatura ambiente (no todo el reactivo se disuelve y se forma algún precipitado). Después de una breve centrifugación y filtración (0.45 µm) la solución se desaliniza luego en Sephadex G25 fino (Farmacia) en PBS (índice de flujo 2 ml/min) produciendo aproximadamente 11 mg de KLH activado en 1.5 mg/ml (Bradford). Se mezcla 1 ml del KLH activado (1.5 mg) con 1 ml de una solución de 9 mg/ml en agua de hUL-17 derivado de *E. coli* liofilizado (lote BM-E3141/98). La solución permanece clara y se incuba durante 2 hrs a temperatura ambiente. La concentración del complejo resultante es 1.4 mg/ml (medida por Bradford). Se mezcla 1 ml del KLH activado (1.5 mg) con 1 ml de hUL-17 HEK.EBNA (aproximadamente 3 mg en agua; lote En.E-3382/83). La solución permanece clara y se incuba durante 2 hrs a temperatura ambiente. La concentración (Bradford) es 2.9 mg/ml.
- 10
- 15 Inmunización: Ratones modificados con ingeniería genética 27340 (hembras; MEDAREX Inc, Annandale, NJ) en los que los genes de parte variable y constante de inmunoglobulina de murino se reemplazan funcionalmente por sus contrapartes humanas (código Genotype Tg 221100-TgH (CMD)++;TgN(Hco7)11952+; TgH(JKD)++; TgN(KCO5)9272+ (véase también Sherie L. Morrison, 1994, Nature, Vol. 368, p. 812-813; Nils Lonberg et al., 1994, Nature, Vol. 368, p. 856-859) se inmunizan siguiendo el esquema reportado en la tabla 1.

20 Tabla 1. Calendario de Inmunización

Día	Fecha	Inmunógeno	Dosis y ruta de inmunización
0	07.06.01	HuL-17 (BM-E3141/98) acoplado a KLH mezclado 1:1 con huL-17 (BM-E3141/98) en adyuvante Gerbu	25 µg de cada inyección s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
14	21.06.01 (1er refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) acoplado a KLH mezclado 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) acoplado a KLH en adyuvante Gerbu	25 µg de cada inyección s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
28	05.07.01 (2do refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) mezclado 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) en adyuvante Gerbu	10 µg de cada inyección s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
35	12.07.01		Suero recolectado para ELISA
42	19.07.01 (3er refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) mezclado 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) acoplado a KLH en adyuvante Gerbu	20 µg de cada inyección s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
63	09.08.01 (4to refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) acoplado a KLH mezclado 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) acoplado a KLH en adyuvante Gerbu	20 µg de cada inyección s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
91	06.09.01 (5to refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) mezclado 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) en adyuvante Gerbu	20 µg de cada inyección s.c. en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante 100 µl
99	14.09.01		Suero recolectado para ELISA
117	02.10.01	HuL-17 (En.E-3382/83) HuL-17 (En.E-3382/83) acoplado a KLH	10 µg/ratón i.v. 10 µg/ratón i.p.
118	03.10.01	HuL-17 (En.E-3382/83) acoplado a KLH	10 µg/ratón i.p.
119	04.10.01	HuL-17 (En.E-3382/83) acoplado a KLH	10 µg/ratón i.p.
120	05.10.01	Fusión	

Se obtienen muestras de suero 35 y 99 días después del inicio del protocolo de inmunización, para medir niveles de anticuerpo anti-huL17 mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

Generación de hibridomas: En el día 120, se sacrifican ratones 27340 mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Se fusionan células de bazo totales (1 x 10<sup>8</sup>) con células PAI-0 (5 x 10<sup>7</sup> células) utilizando PEG 4000. Las células fusionadas se colocan en placas en 720 pozos (1 ml/pozo), que contiene una capa de alimentación de células peritoneales de ratón (ratones Balb/c), en medio HAT (RPMI 1640 que contiene 2 g/l de Bicarbonato de sodio, 5 x 10<sup>-5</sup> M de β-Mercaptoetanol, 10<sup>-4</sup> M de Hipoxantina, 1.6 x 10<sup>-5</sup> M de Timidina, 4 x 10<sup>-7</sup> M de Aminopterina, 10% de FCS inactivado por calor y 50 µg/ml de Gentamicina). En el día 14, el medio HAT se intercambia con medio HT es decir medio HAT sin Aminopterina. La detección inicia en el día 10, y dura dos semanas. De las placas de 720 pozos iniciales, 684 pozos (95%) son positivos para el crecimiento de hibridoma. Se recolectan los sobrenadantes y se seleccionan para MAb reactivo huIL-17 en ELISA utilizando el E. coli y huIL-17 derivado de HEK/EBNA. Cincuenta y dos pozos principales tienen resultados positivos para la presencia de anticuerpos anti-huIL-17. Se clonan veintiocho hibridomas y se congelan los restantes. Se hace la clonación, en placas de microtítulo de 4 x 96 pozos, en medio HT y una capa de alimentación de células peritoneales de ratón. Se colocan en placas los hibridomas a 0.5 célula/100 µl por pozo. Los pozos se seleccionan microscópicamente para crecimiento, y los positivos se cargan en 100 µl de medio HT. Al siguiente día, los sobrenadantes se prueban para la producción de anticuerpo en un ELISA específico huIL-17. Luego de clonación, la mayor parte de los hibridomas clonados retienen la capacidad de secretar el Anticuerpo Monoclonal específico anti-huIL-17 (MAb).

Producción y purificación de anticuerpo: Se transfieren los clones seleccionados en medio libre de suero (5 ml) en matraces de 25 cm<sup>2</sup> de TC (TC: cultivo de tejido). Los hibridomas se expanden progresivamente en medio libre de suero en matraces de 75 cm<sup>2</sup> de TC y matraces "roller". Todos los MAb anti-hu-IL-17 diferentes que incluyen NVP-AIN457-NX (340-110-28 es decir número de ratón-número de hibridoma-número de clon) se purifican mediante cromatografía de afinidad de Proteína A. Los sobrenadantes de cultivo se ajustan a pH 7.3 y se cargan en una columna de tamaño apropiado de Proteína A Sefarosa 4 de flujo rápido (Pharmacia). Después de lavado inicial con 100 mM de regulador de fosfato, pH 7.3 los anticuerpos unidos se eluyen con 50 mM de citrato, pH 2.7, 140 mM de NaCl. La fracción eluida se neutraliza inmediatamente (pH 7.0) y se filtra estéril. La concentración de proteína se determina mediante absorción a 280 nm utilizando un factor de Unidad de Absorción 1.35 (AU)/mg.

Actividad de inhibición de MAb anti-huIL-17 sobre la producción de IL-6 inducida por huIL-17 en fibroblastos de dermis humana: Se cultivan fibroblastos de dermis humana en FBM complementado con 2% de FCS, insulina (5 µg/ml) huFGF-básico (0.1 µg/ml) y Gentamicina (50 µg/ml). Los fibroblastos se separan del plástico utilizando una solución de Tripsina/EDTA. Los fibroblastos se distribuyen en placas de microtítulo de 96 pozos en una densidad de 1x10<sup>4</sup> células/pozo en FBM complementado con 1% de FCS. Se dejan adherir los fibroblastos a las placas durante la noche. A la siguiente mañana el medio se remueve y el FBM fresco complementado con 1% de FCS, huIL-17 (diferentes concentraciones que varían de 30 a 500 ng/ml) y sobrenadantes de hibridoma (dilución final 1/5) o los anticuerpos purificados se agregan a un volumen final de 200 µl. Se recolectan los sobrenadantes de cultivo después de la incubación a 24 h y se mide la producción de huIL-6 mediante ELISA.

ELISA para la detección de anticuerpos anti-huIL-17: Se cubren placas de microtítulo ELISA con huIL-17 recombinante (100 µl/pozo a 3 µg/ml; lote BM-E3141/98 o En.E-3382/82) en PBS 0.02% de NaN<sub>3</sub> y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, se bloquean las placas de microtítulo con 300 µl de PBS/2% de BSA/ 0.02% de NaN<sub>3</sub> durante 2 h a 37°C. Las placas luego se lavan 4 veces con PBS/ 0.05% de Tween 20/ 0.02% de NaN<sub>3</sub>. Se agregan las diluciones de suero de ratón 27340 (rango de dilución final en el día 35: 1/100 a 1/3200; rango de dilución final en el día 99: 1/200 a 1/12800; 100 µl/pozo) o los sobrenadantes de cultivo de hibridomas (dilución final 1:3; 100 µl/pozo). Después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, las placas se lavan 4 veces con PBS/ 0.05% de Tween 20/ 0.02% de NaN<sub>3</sub>. Se agrega un anticuerpo específico de fragmento Fc, anti-hu-IgG de ratón conjugado con biotina, en una dilución final de 1/20000 (100 µl/pozo). Las muestras se dejan reaccionar durante 4 h a temperatura ambiente. Después de lavar (4 veces), se agrega estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina en una dilución final de 1/8000 (100 µl/pozo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavan de nuevo 4 veces y se agrega el sustrato (p-nitrofenilfosfato en regulador dietilamino pH 9.8; 150 µl/pozo). Las placas se leen después de 30 o 45 min dependiendo del desarrollo de la reacción en el lector de microtítulo (Bio-Rad) utilizando filtros de 405 y 490 nm.

ELISA para detección del isotipo de anticuerpo: Para revelar el isotipo MAb, los sobrenadantes de cultivo (100 µl; dilución final 1/5) se agregan a los pozos de placas de microtítulo recubiertas con huIL-17 (véase lo anterior), y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavado (4 veces), 100 µl/pozo de IgG1 anti-humano MAb de ratón conjugado con biotina (dilución final 1/1000), IgG2 (dilución final 1/1000), IgG3 (dilución final 1/1000) IgG4 (dilución final 1/2000) o cadena ligera κ Anti-Humana (dilución final 1/1000) se agregan durante 4 h a temperatura ambiente. Como un control se utiliza MAb específico de cadena ligera λ1 y λ2 anti-ratón de rata conjugado con biotina (dilución final 1/1000). Esto está seguido, como se describió previamente, mediante lavado y adición de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (100 µl; dilución final 1/8000). Después de lavar (4 veces) se agrega el sustrato (p-nitrofenilfosfato en regulador dietilamino; 100 µl). Las placas se leen después de 30 o 45 min dependiendo del desarrollo de la reacción, en un lector de microtítulo (Bio-Rad) utilizando filtros de 405 y 490 nm.

ELISA para la detección de la producción de huIL-6: Se cubren placas de microtítulo ELISA con un MAb de ratón anti-huIL-6 (MAB206 de R&D system; 100 µl/pozo a 4 µg/ml) en PBS 0.02% de NaN<sub>3</sub> y se incuban durante la noche



5 a temperatura ambiente. Al siguiente día, las placas de microtítulo se bloquean con 300 µl de PBS/2% de BSA/ 0.02% de NaN<sub>3</sub> durante 2 h a 37°C. Las placas luego se lavan 4 veces con PBS/ 0.05% de Tween 20/0.02% de NaN<sub>3</sub>. Se agregan los sobrenadantes de cultivo de los fibroblastos de dermis humana (dilución final 1:3; 100 µl/pozo). Para establecer una curva de titulación huL-6 (100 µl/pozo) se titula de 400 µg/ml a 3.1 µg/ml en etapas de dilución 1:2. Después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, las placas se lavan 4 veces con PBS/ 0.05% de Tween 20/0.02% de NaN<sub>3</sub>. Se agrega un anticuerpo anti-huL-6 de cabra conjugado con biotina (BAP206; R&D Systems) (25 ng/ml; 100 µl/pozo). Las muestras se dejan reaccionar durante 4 h a temperatura ambiente. Después de lavar (4 veces), se agrega estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina en una dilución final de 1/8000 (100 µl/pozo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavan de nuevo 4 veces y se agrega el sustrato (p-nitrofenilfosfato en regulador dietilamino pH 9.8; 150 µl/pozo). Las placas se leen después de 10 30 min en un lector de microtítulo (Bio-Rad) utilizando filtros de 405 y 490 nm. Cálculos: Los valores se reportan como valores O.D. originales o como el % de inhibición calculado sobre la media de valores duplicados. Se reportan datos adicionales como Media ± EEM. Se utiliza una curva estándar huL-6 para medir la concentración de huL-6 en los sobrenadantes de cultivo utilizando un ajuste cúbico de curva.

15 Resultados

Títulos de suero de ratón 27340:

Tabla 2. Títulos de suero Anti-huL-17 (ratón 27340)

Dilución en suero

Valores O.D. (Media ± EEM)

Día	Lote HuL-17*	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
	E. coli	1.795 ± 0.022	1.524 ± 0.006	1.167 ± 0.015	0.854 ± 0.013	0.615 ± 0.005	0.378 ± 0.032		
35	HEK/EBNA	2.180 ± 0.041	1.875 ± 0.005	1.577 ± 0.047	1.313 ± 0.016	1.031 ± 0.011	0.728 ± 0.003		
99	E. coli		2.130 ± 0.078	1.913 ± 0.075	1.635 ± 0.041	1.494 ± 0.066	1.125 ± 0.001	0.810 ± 0.070	0.559 ± 0.021
	HEK/EBNA		2.029 ± 0.005	1.925 ± 0.030	1.716 ± 0.012	1.524 ± 0.004	1.259 ± 0.018	0.970 ± 0.036	0.706 ± 0.002

\* Se recubren las placas de microtítulo con huL-17 (3 µg/ml) de E. coli (BM-E3141/98) o células HEK/EBNA (En.E-3382/82).

20

El suero de ratón 27340 se analiza en ELISA para la presencia de anticuerpos anti-huL-17 en los días 35 y 99 en dos preparaciones diferentes de huL-17 (Tabla 2). Los resultados muestran que los títulos de suero de ratón 27340 se incrementan aproximadamente cuatro veces entre el día 35 y el día 99 y que se reconocen las preparaciones huL-17.

25 Unión en ELISA de los sobrenadantes de hibridoma: Se prueban 684 sobrenadantes en ELISA para la presencia de anticuerpos anti- huL-17, utilizando dos preparaciones de huL-17 recombinante, el primero de E coli (BM-E3141/98) el último de células HEK/EBNA (En.E-3382/82). Se clasifican cincuenta y dos sobrenadantes positivos para la presencia de anticuerpos anti-huL-17 (Tabla 3). La unión preferencial a una o a la otra preparación de huL-17 se observa en unos pocos casos. Se subrayan los 28 hibridomas que se clonan posteriormente.

30 Tabla 3. Reactividad de ELISA de los sobrenadantes de cultivo

Hibridoma (No)	Lote HuL-17 *			Hibridoma (No)	Lote HuL-17		
	Valores de E. coli	O.D.	HEK/ EBNA valores O.D.		Valores de E. coli	O.D. de	HEK/ EBNA valores O.D.
<u>1</u>	<u>1.935/1.830</u>		<u>ND</u>	<u>386</u>	<u>1.780/1.812</u>		<u>2.002/1.905</u>
<u>3</u>	<u>1.928/1.928</u>		<u>2.026/1.956</u>	<u>435</u>	<u>2.194/2.139</u>		<u>2.221/2.169</u>

ES 2 677 245 T3

<u>5</u>	<u>1.386/1.471</u>	<u>2.099/2.042</u>	<u>439</u>	<u>1.180/1.236</u>	<u>1.442/1.470</u>
<u>59</u>	<u>1.917/2.078</u>	<u>2.342/2.384</u>	<u>444</u>	<u>1.034/1.066</u>	<u>1.166/1.138</u>
<u>66</u>	<u>1.629/1.619</u>	<u>ND</u>	<u>450</u>	<u>2.060/2.209</u>	<u>2.079/2.237</u>
<u>104</u>	<u>2.650/2.716</u>	<u>2.439/2.366</u>	<u>477</u>	<u>1.392/1.348</u>	<u>1.515/1.524</u>
<u>106</u>	<u>1.329/1.371</u>	<u>1.362/1.465</u>	<u>496</u>	<u>2.131/2.078</u>	<u>2.569/2.798</u>
<u>110</u>	<u>2.355/2.363</u>	<u>2.425/2.497</u>	<u>504</u>	<u>1.755/1.559</u>	<u>ND</u>
<u>112</u>	<u>0.789/0.857</u>	<u>1.154/1.208</u>	<u>543</u>	<u>2.332/2.455</u>	<u>2.370/2.381</u>
<u>116</u>	<u>1.656/1.652</u>	<u>ND</u>	<u>544</u>	<u>1.145/1.196</u>	<u>1.187/1.201</u>
<u>128</u>	<u>1.244/1.669</u>	<u>0.714/0.695</u>	<u>548</u>	<u>0.728/0.750</u>	<u>0.891/0.909</u>
<u>142</u>	<u>1.192/1.322</u>	<u>0.847/0.810</u>	<u>552</u>	<u>0.824/0.811</u>	<u>0.969/0.943</u>
<u>173</u>	<u>1.899/2.108</u>	<u>1.966/2.023</u>	<u>557</u>	<u>2.241/2.326</u>	<u>2.347/2.483</u>
<u>182</u>	<u>0.948/0.903</u>	<u>0.874/0.866</u>	<u>564</u>	<u>0.628/0.675</u>	<u>0.808/0.820</u>
<u>190</u>	<u>2.249/2.084</u>	<u>2.150/2.139</u>	<u>566</u>	<u>1.092/1.068</u>	<u>1.239/1.152</u>
<u>196</u>	<u>1.406/1.305</u>	<u>1.797/1.752</u>	<u>577</u>	<u>1.018/0.928</u>	<u>1.226/1.206</u>
<u>216</u>	<u>1.120/1.146</u>	<u>1.114/1.128</u>	<u>597</u>	<u>0.781/0.821</u>	<u>1.117/1.121</u>
<u>234</u>	<u>1.890/1.990</u>	<u>ND</u>	<u>612</u>	<u>1.935/1.777</u>	<u>2.033/1.989</u>
<u>277</u>	<u>1.674/1.640</u>	<u>ND</u>	<u>622</u>	<u>2.121/2.230</u>	<u>2.592/2.277</u>
<u>285</u>	<u>0.678/0.789</u>	<u>0.735/0.784</u>	<u>627</u>	<u>1.000/1.077</u>	<u>1.203/1.209</u>
<u>298</u>	<u>2.475/2.677</u>	<u>2.340/2.358</u>	<u>649</u>	<u>1.335/1.389</u>	<u>1.311/1.337</u>
<u>305</u>	<u>1.721/1.789</u>	<u>0.602/0.634</u>	<u>658</u>	<u>1.218/1.297</u>	<u>1.415/1.437</u>
<u>319</u>	<u>1.111/1.073</u>	<u>1.223/1.202</u>	<u>674</u>	<u>1.112/1.087</u>	<u>1.134/1.127</u>
<u>328</u>	<u>1.738/1.762</u>	<u>1.869/1.835</u>	<u>686</u>	<u>1.447/1.549</u>	<u>1.730/1.646</u>
<u>343</u>	<u>2.478/2.702</u>	<u>2.302/2.448</u>	<u>705</u>	<u>1.899/1.803</u>	<u>1.870/1.872</u>
<u>373</u>	<u>1.200/1.194</u>	<u>1.212/1.233</u>	<u>720</u>	<u>2.249/2.420</u>	<u>2.383/2.385</u>

\*Se recubren placas con huIL-17 recombinante (3 µg/ml) de E. coli (BM-E3141/98) o células HEK/EBNA (En.E-3382/82). Los sobrenadantes se prueban en la dilución final de 1/3.

5 Unión en ELISA de los sobrenadantes de cultivo de los clones de hibridoma: En la Tabla 4 se muestra la reactividad en ELISA de los sobrenadantes de los clones de los 11 hibridomas, que retienen la mejor producción de MAb anti-huIL-17. Los clones, se resaltan en negrilla, se seleccionan para producir ~1 litro de sobrenadante en botellas "roller" para la purificación y análisis de los anticuerpos. Con la excepción de los clones derivados del hibridoma No 5, que producen anticuerpo huIgG3k, todos los otros clones producen MAb huIgG1k, cuando se evalúa por los anticuerpos monoclonales específicos de isotipo.

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

Clon (No)	Sobrenadantes* Valores O.D.	Clon (No)	Sobrenadantes* Valores O.D.	Clon (No)	Sobrenadantes* Valores O.D.
3-2	2.198/1.940	<u>106-1</u>	<u>1.244/1.306</u>	<u>543-4</u>	<u>1.003/0.913</u>
<u>3-20</u>	<u>1.909/1.939</u>	106.2	1.203/1.138	543-16	0.795/0.717
3-21	1.873/1.812	106-3	1.176/1.166	557-6	0.879/0.940

## ES 2 677 245 T3

5-18	1.240/1.168	110-7	1.535/1.393	557-36	0.980/0.925
5-22	1.340/1.396	<u>110-28</u>	<u>1.376/1.370</u>	557-37	1.104/1.109
5.29	1.316/1.354	305-21	1.484/1.518	<u>622-2</u>	<u>0.923/0.894</u>
5.31	1.227/1.302	<u>305-38</u>	<u>1.669/1.858</u>	622-5	1.070/1.032
<u>5-40</u>	<u>1.364/1.543</u>	<u>343-1</u>	<u>1.351/1.375</u>	622-6	0.980/0.953
104-2	1.385/1.299	439-80	2.506/2.543	658-2	0.744/0.744
104-4	1.085/1.044	450-13	1.568/1.610	658-6	0.769/0.772
104-9	1.488/1.304	<u>450-23</u>	<u>1.658/1.667</u>	<u>658-16</u>	<u>0.741/0.758</u>
<u>104-11</u>	<u>1.670/1.380</u>	543-1	1.074/0.991		

Se recubren placas de microtítulo con huIL-17 recombinante (3 µg/ml) de células HEK/EBNA (En.E-3382/82).

5 Actividad neutralizante de los sobrenadantes de cultivo: Los sobrenadantes de cultivo se prueban para la inhibición de la producción de huIL-6 mediante fibroblastos de dermis humana estimulados con huIL-17 recombinante. Como se muestra en la Tabla 5, la mayor parte de los sobrenadantes de cultivo muestran actividad de inhibición.

Tabla 5. Inhibición de la producción de IL-6 inducido por huIL-17 en fibroblastos de dermis humana al cultivar sobrenadantes

Inhibición de la producción de IL-6 (%)

Clon	Cantidad de huIL-17 utilizado como estímulo (ng/ ml)			
	62.5	125	250	500
(No)				
3-20	86.3	75.0	33.1	23.2
5 -40	23.3	41.4	20.3	19.0
104-11	47.7	48.5	22.2	16.3
106.1	61.6	19.8	5.7	9.8
110-28	99.8	92.5	88.6	61.3
305-38	47.2	47.1	36.6	23.7
343-1	96.8	102.4	90.5	66.4
450-23	51.7	48.5	47.5	26.6
543.4	-6.0	-12.0	-6.5	-7.1
622-2	34.0	23.2	20.3	18.4
658-16	34.4	27.7	12.7	18.8

10 Actividad neutralizante de AIN45: Selección del clon 110-28 para la producción del candidato AIN457 desarrollado (realización preferida de la invención) se basa en la actividad neutralizante y la medición de afinidad en BIACORE 2000 de los anticuerpos purificados (véase Ejemplo 2 adelante).

15 **Ejemplo 2:** El AIN457 se une con muy alta afinidad a la IL-17 humana recombinante (huIL-17); el KD es  $122 \pm 22$  pM (BIAcore) y neutraliza la producción de IL-6 humana inducida por huIL-17 en fibroblasto dérmico humano; el IC50 tiene  $2.1 \pm 0.1$  nM en una concentración de 1.87 nM huIL-17

a) Métodos

Reactivos: Se compran reactivos de laboratorio generales de Merck o Sigma y están disponibles en el grado de la más alta pureza; las fuentes de reactivos especiales se detallan adelante.

5 Proteínas: Se generan anticuerpos monoclonales al inmunizar ratones transgénicos MEDAREX con la IL-17 humana recombinante, y luego se sigue el procedimiento estándar para producir las estirpes celulares, de las que el material secretado se puede purificar mediante cromatografía de Sefarosa de Proteína A [esencialmente como se describe en el Ejemplo 1). El AIN457 se almacena como una solución filtrada estéril en 50 mM de Na-citrato, pH 7.0, 140 mM de NaCl a 4°C. El AIN457 humano recombinante (lote KB03303A) se obtiene en solución madre estéril de 20 mM de Na-citrato/40 mM de regulador de fosfato, pH 7, 150 mM de NaCl o 20 mM de ácido acético pH 5.5 ajustado con Tris-base 1M. Las concentraciones están usualmente en el rango de 2 mg/ml y se diluyen en una concentración final de 5 µg/ml en el regulador BIA (20 mM de HEPES, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 0,05% v/v de Tween-20) para los experimentos Biacore.

10 La IL-17 humana recombinante es de producción propia; lote En/E 3882/83; 0.29 mg/ml.

Mediciones BiAcCore

15 La determinación de los parámetros de unión cinética y los niveles de reactividad cruzada se hacen mediante mediciones de resonancia de plasmón de superficie utilizando el biosensor óptico BiAcCore 2000 (BiAcCore AB, Upsalla, Suecia, véase Lit. HS 1,2 para detalles). Esta tecnología permite la determinación libre de etiqueta de constantes de índice microscópico para unión (kon) y disociación (koff) de un ligando a un receptor. Por lo tanto, es especialmente adecuado para caracterizar las interacciones de anticuerpo-antígeno. Esta tecnología complementa y es en muchos aspectos superior a las mediciones ELISA (Van Regenmortel, Dev Biol (Basel). 2003; 112:141-51.). Los estudios de unión del IL-17 recombinante al anticuerpo AIN457 IL-17 se desarrollan en dos formas. En el protocolo estándar, se captura el AIN457 mediante un anticuerpo Fcγ anti-humano (Jackson Immunochemicals; Cat. No. 109-005-098) que se inmoviliza previamente en un chip sensor CM-5 BiAcCore (Research grade). La unión covalente del anticuerpo de captura Fcγ se hace con el 'Equipo de acoplamiento de Amina' proporcionado por BiAcCore (BiAcCore, Cat. No. BR-1000-50). Típicamente, 3000 RU del anticuerpo de captura se adhieren a la superficie de dextrano activada con una solución de anticuerpo anti Fcγ de 30 µg/ml en 10 mM de regulador Ac, pH 4.5 en un índice de flujo de 5 µl/min que conduce a aproximadamente 250 RU de inmovilización AIN457. Como una directriz, 1000 RU corresponden a una transferencia de masa de 1 ng/mm<sup>2</sup>. Alternativamente, IL-17 (Sección 3.2; Tabla 4), anticuerpo AIN457 se acopla directamente a la superficie del chip sin capturar el anticuerpo. Los resultados se comparan con el protocolo descrito en la Tabla 9 (véase adelante).

b) Resultados

Cinéticas de unión del complejo AIN457 IL-17/

30 La constante de disociación de equilibrio  $K_D$  permite algún juicio acerca de la estabilidad de los complejos, una vez formados in vivo. Por lo tanto, hemos determinado las constantes cinéticas para la unión de la IL-17 humana al anticuerpo AIN457 inmovilizado, y hemos derivado el  $K_D$  para el proceso a partir de estos datos. La Tabla 3 muestra el resumen de los datos obtenidos cuando las curvas de 2 experimentos se ajustan al modelo Langmuir utilizando el software BIA 3.0 evaluation. Aunque el anticuerpo es, por supuesto, bivalente, la unión se puede tratar como un evento 1:1, con los sitios de unión a anticuerpo individuales exhibidos en la superficie que llega a estar ocupada por las moléculas In-17 monoméricas.

40 Este experimento muestra, la asociación extremadamente rápida así como también las cinéticas de disociación muy lentas del complejo de anticuerpo-quimioquina. Se obtienen mejores datos de ajuste cuando los sensogramas se tratan individualmente (a diferencia de globalmente, como se sugiere en la BIA evaluation.) Así, después de combinar las series de titulación obtenemos valores promedio de 12 sensogramas de  $k_{on} = (4.1 \pm 0.1) \times 10^5$  1/M s;  $k_{off} = (3.8 \pm 0.5) \times 10^{-4}$  1/s; y para  $K_D = 122 \pm 22$  pM.

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

Conc [nM]	kon [1/Ms]	koff [1/s]	KD [M]	Exp. IL-314
2	3.31E+05	3.36E-05	1.02E-10	Serie 1
4	1.28E+05	3.78E-05	2.95E-10	
8	3.79E+05	1.86E-05	4.90E-11	
12	3.60E+05	3.00E-05	8.33E-11	
16	3.52E+05	5.70E-05	1.62E-10	
20	3.52E+05	4.15E-05	1.18E-10	
2	1.23E+06	1.97E-05	1.60E-11	
4	4.11E+05	1.20E-05	2.92E-11	

## ES 2 677 245 T3

8	3.78E+05	4.54E-05	1.20E-10	
12	3.46E+05	5.13E-05	1.48E-10	
16	3.17E+05	5.95E-05	1.88E-10	
20	3.34E+05	5.01E-05	1.50E-10	
Media	4.10E+05	3.80E-05	1.22E-10	n=12
EEM	7.73E+04	4.51E-06	2.21E-11	

Media  $K_D$  calculada de entradas individuales (verticalmente), a diferencia de aplicar la ecuación  $K_D = k_{off}/k_{on}$

5 Para el AIN457 producido en células recombinantes (KB03303A) se realizan mediciones de afinidad para las citoquinas IL-17 de hombre, tití, macaco de la india y macaco de java, respectivamente. Los detalles experimentales de las mediciones Biacore son iguales como se describió anteriormente para el anticuerpo MAB110-28. Se realizan dos pruebas de series independientes de 6 concentraciones de IL-17 en cada serie. Las concentraciones para la IL-17 humana son 2, 4, 8, 12, 16, 20 nM y 10, 20, 30, 40, 50, 60 nM para todas las otras especies. El análisis de los datos completos produce n=12 mediciones individuales para cada especie IL-17. Se reporta el  $K_D$  así como también EEM.

10 Tabla 4. Resumen: Constantes cinéticas para la unión 1:1 de rec humano, tití, macaco de la india y macaco de java IL-17 a NVP-AIN457 (KB03303A)

Especies	KD [M] Media Serie 1+2	SEM
Humano	0.227 nM	+/- 0.03 nM
Tití	1.2 nM	+/- 0.1 nM
Macaco de la india	9 nM	+/-1 nM
Macado de java	6 nM	+/- 0.7 nM

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

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

Conc [nM]	kon [1/Ms]	koff [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/ IL-365
2	3.37E+05	6.43E-05	1.91E-10	Serie 1
4	2.59E+05	7.76E-05	2.99E-10	
8	2.12E+05	5.21E-05	2.46E-10	
12	2.18E+05	7.38E-05	3.38E-10	
16	2.02E+05	7.15E-05	3.54E-10	
20	1.92E+05	8.04E-05	4.20E-10	
2	5.50E+05	7.01E-05	1.27E-10	Serie 2
4	3.22E+05	3.30E-05	1.02E-10	
8	2.85E+05	4.73E-05	1.66E-10	
12	2.86E+05	4.84E-05	1.69E-10	
16	2.61E+05	3.09E-05	1.18E-10	
20	2.58E+05	4.90E-05	1.90E-10	

## ES 2 677 245 T3

Media	2.82E+05	5.82E-05	2.27E-10	n=12
EEM	2.77E+04	4.91E-06	3.00E-11	

Tabla 6. Constantes cinéticas para la unión 1:1 de IL-17 de tití rec a AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	kon [1/Ms]	koff [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/ IL-365
10nM	8.89E+04	7.96E-05	8.95E-10	Serie 1
20nM	1.11E+05	8.69E-05	7.82E-10	
30nM	9.82E+04	1.15E-04	1.17E-09	
40nM	9.92E+04	1.16E-04	1.17E-09	
50nM	9.81E+04	1.19E-04	1.21E-09	
10nM	8.83E+04	9.98E-05	1.13E-09	Serie 2
20nM	1.10E+05	1.28E-04	1.17E-09	
30nM	9.70E+04	1.52E-04	1.57E-09	
40nM,	9.66E+04	1.31E-04	1.36E-09	
50nM	9.52E+04	1.59E-04	1.67E-09	
Media	9.83E+04	1.19E-04	1.21E-09	n=10
EEM	2.36E+03	8.09E-06	±0.1	

Tabla 7. Constantes cinéticas para la unión 1:1 de IL-17 de macaco de la india rec a AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	kon [1/Ms]	koff [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/ IL-365
10	1.70E+05	3.89E-04	2.28E-09	Serie 1
20	6.73E+04	4.94E-04	7.34E-09	
30	5.86E+04	3.54E-04	6.04E-09	
40	3.27E+04	4.05E-04	1.24E-08	
50	4.05E+04	4.55E-04	1.12E-08	
60	3.50E+04	4.60E-04	1.31E-08	
10	5.47E+04	3.85E-04	7.04E-09	Serie 2
20	4.62E+04	2.74E-04	5.93E-09	
30	4.30E+04	3.51E-04	8.16E-09	
40	3.76E+04	3.66E-04	9.74E-09	
50	3.60E+04	4.32E-04	1.20E-08	
60	3.44E+04	4.24E-04	1.23E-08	
Media	5.47E+04	3.99E-04	8.96E-09	n=12
EEM	1.09E+04	1.72E-05	9.70E-10	

Tabla 8. Constantes cinéticas para la unión 1:1 de IL-17 de macaco de java rec a AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	kon [1/Ms]	koff [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/ IL-365
5nM	3.27E+05	3.60E-04	1.10E-09	Serie 1
10nM	1.79E+05	4.02E-04	2.24E-09	
15nM	1.03E+05	5.67E-04	5.50E-09	
20nM	1.10E+05	5.23E-04	4.75E-09	
25nM	9.23E+04	5.78E-04	6.26E-09	
30nM	9.05E+04	7.14E-04	7.89E-09	
5nM	7.18E+04	5.08E-04	7.08E-09	Serie 2
10nM	9.70E+04	6.69E-04	6.90E-09	
15nM	1.03E+05	7.66E-04	7.41E-09	
20nM	1.02E+05	7.32E-04	7.17E-09	
25nM	1.02E+05	7.47E-04	7.34E-09	
30nM	1.00E+05	8.34E-04	8.32E-09	
Media	1.23E+05	6.17E-04	6.00E-09	n=10
EEM	1.99E+04	4.34E-05	6.52E-10	

Posteriormente se evalúa la actividad de inhibición del AIN457 purificado (Lote En/E-10333/53; 0.54 mg/ml) en huIL-17. Los valores IC<sub>50</sub> se muestran en la Tabla 6. En estos experimentos, huIL-17R/Fc y un MAb de ratón anti-huIL-17 se incluyen como controles positivos y Simulect como control negativo.

- 5 Tabla 9. Neutralización de hu-IL-17 mediante el MAb AIN457 anti-huIL-17 humano o en comparación con IL-17R/Fc, y un MAb de ratón anti-huIL-17 (R&D System).

	AIN457	IL-17 R/Fc	MAB 317
	IC <sub>50</sub> ± EEM	IC <sub>50</sub> ± EEM	IC <sub>50</sub> ± EEM
	(n=3*)	(n=3)	(n=3)
Recombinante	huIL-17 2.071 ± 0.116 nM	1.713 ± 0.305 nM	12.226 ± 2.050 nM

@ 1.87 nM (30 ng/ml)

\*Se calculan la Media y EEM de tres experimentos diferentes e independientes.

- 10 En conclusión, el AIN457 aboga la secreción dependiente de IL-17 de huIL-6 mediante fibroblastos de dermis humana. La potencia es comparable con aquella de huIL-17R/Fc y superior a aquella de un MAb anti-huIL-17 de ratón comercialmente disponible. Es interesante notar que se observa una inhibición más completa con AIN457 que con IL-17R/Fc.

Ejemplo 3: Pureza y secuencias de aminoácidos parciales del secuenciamiento de aminoácido de cadena ligera y pesada

- 15 Secuencias de aminoácidos de terminal amino de las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>: Los primeros 48 residuos de aminoácido de la cadena ligera y pesada para dos anticuerpos anti-IL-17A, clon 110-7 (véase tabla 4) y 110-28 (véase tabla 4), se determinan mediante degradación de Edman. La secuencia de aminoácidos es idéntica para ambos clones. Se busca el GeneBank mediante análisis de ráfaga y se utiliza la secuencia de ADN más homóloga encontrada para designar los cebadores de clonación.

- 20 Clonación molecular de las regiones V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>: Se prepara ARN total de 2x10<sup>7</sup> células de hibridoma (clon 110-7, clon 110-28) con el Equipo RNeasy Midi de acuerdo con el protocolo del vendedor (Quiagen Hilden Alemania). Se eluye

ARN total en 200µl de RNasa libre de agua y se almacena a -80°C. La síntesis de cADN de la primera hebra se lleva a cabo con transcriptasa inversa M-MLV (Promega, Madison, WI), cebador oligo-dT, mezcla de nucleótido PCR (dNTP) e inhibidor ARNsin (Roche, Mannheim). Se mezcla cinco µg de ARN total con 1 µl de cebador oligo-dT (0.5 µg/µl), y se agrega RNasa libre de agua en un volumen final de 36 µl. La mezcla se incuba a 70°C durante 10 minutos y luego se almacena en hielo. Mientras está en hielo, se agregan los siguientes reactivos: 10µl 5x RT de regulador, 2µl de dNTP (10mM cada uno), 2 µl de RNasin y 1µl de transcriptasa inversa M-MLV. La reacción se lleva a cabo a 42°C durante 1 hora.

La reacción PCR se ensambla utilizando 4 µl de plantilla de cADN 2µl de cada cebador en 10 µM cada uno (véase adelante y Tablas 10 y 11 para revisión) 20µl de 2xQiamix (que contiene Regulador, dNTP, TAQPolimerasa) y 1µl de polimerasa de ADN Pwo en un volumen total de 40 µl. Las condiciones PCR se fijan para 35 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 55°C para 20 segundos y 72°C para 30 segundos. El producto PCR se subclona en el vector de clonación pCR4-TOPO-Zero (Stragagene, La Jolla, Ca.). Varios clones se añaden a cada reacción y la secuencia de nucleótido se determina por Solvias AG (Basilea), utilizando los cebadores MV432 (SEQ ID NO: 21), MV433 (SEQ ID NO: 22), MV434 (SEQ ID NO: 23), MV435 (SEQ ID NO: 14), y los cebadores estándar en el ADN de vector.

El cADN que codifica la cadena pesada se amplifica utilizando los pares de cebador MV416 (SEQ ID NO: 15)/#265 (SEQ ID NO: 16) y MV418 (SEQ ID NO: 17) /#265 (SEQ ID NO: 16). Los cebadores cubren las secuencias de nucleótido que corresponden a las siguientes posiciones de aminoácido de la cadena pesada: posición MV416 -19/-13 (péptido de señal); posición MV418 +1/+7; posición #265 n +253/+259. La posición +1 es el primer aminoácido de la proteína madura.

El cADN que codifica la cadena ligera se amplifica utilizando los pares de cebador MV417 (SEQ ID NO: 18)/#223 (SEQ ID NO: 19) y MV419 (SEQ ID NO: 20)/#223 (SEQ ID NO: 19). Los cebadores cubren las secuencias de nucleótido que corresponden a las siguientes posiciones de aminoácido de la cadena ligera: posición MV417 -20/-14 (péptido de señal); posición MV419 +1/+7; posición #223 +210/+215. Este método permite hacer dos amplificaciones independientes de PCR para cada cadena de inmunoglobulina, que resulta en dos secuencias de ADN independientemente establecidas.

#### Resultados y Discusión

Los productos PCR clonados que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de dos hibridomas (110-7 y 110-28, véase tabla 4 anterior) se caracterizan por el secuenciamiento de ADN. Se utilizan cinco o seis secuencias independientes para ensamblar las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera. Los cADN de cadena ligera son todos idénticos y cubren la secuencia codificante completa (posición de aminoácido -20 a +215). Los cADN de cadena pesada tienen 2 emparejamientos incorrectos diferentes en un cADN cada uno. Estos se excluyen de la secuencia final, que se extiende desde el codón de inicio al final de la región de bisagra después del dominio constante 1 (posición de aminoácido -19 a +238). Las secuencias para ambos hibridomas son idénticas. El cADN obtenido del hibridoma 110-28 se selecciona y se utiliza para todo el trabajo de expresión adicional. La SEQ ID NO: 7 (cADN de cadena pesada de AIN457), SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos de cadena pesada de AIN457), SEQ ID NO: 9 (cADN de cadena ligera AIN457) y SEQ ID NO: 10 (secuencia de aminoácidos de AIN457) muestran la secuencia de ADN que codifica la cadena ligera y la cadena pesada de AIN457, junto con la secuencia de proteína y la posición de los cebadores utilizados para la amplificación PCR y el secuenciamiento de ADN. Las secuencias de ADN se han registrado en PlasNova, número de acceso NPL003689 para la cadena pesada, y número de acceso NPL003690 para la cadena ligera.

La secuencia de aminoácidos encontrada mediante la clonación de cADN es idéntica a aquella obtenida previamente por la degradación de Edman de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina purificadas, que indican que se ha clonado el cADN correcto.

#### Tabla 10: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera

La secuencia de aminoácidos que codifica el dominio variable se coloca en negrilla y se subraya. Se indican los cebadores de oligonucleótido utilizados para clonación (subrayado).



ES 2 677 245 T3

**MV417** ACCATGGAAACCCCAGCGGAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACC  
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60  
 TGGTACCTTTGGGGTCGCCTCGAAGAGAAGGAGGACGATGAGACCGAGGGTCTATGGTGG  
  
 T M E T P A E L L F L L L L W L P D T T -

**MV419** GGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC  
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120  
 CCTCTTTAACACAACCTGCGTCAGAGGTCCGTGGGACAGAAACAGAGGTCCCCTTTCTCGG  
  
 G E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A -  
 ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG  
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180  
 TGGGAGAGGACGTCCCGGTCAGTCTCACAATCGTCGTCGATGAATCGGACCATGGTTCGTC  
  
 T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q -  
 AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGGCATC  
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240  
 TTTGGACCGGTCCGAGGGTCCGAGGAGTAGATACCACGTAGGTCGTCCCGGTGACCGTAG  
  
 K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I -  
 CCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTG  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300  
 GGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCCAGACCCTGTCTGAAGTGAGAGTGGTAGTCGTCTGAC  
  
 P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L -  
 GAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGCACCTTC  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360  
 CTCGGACTTCTAAAACGTCACATAATGACAGTCGTCATACCATCGAGTGGAGCGTGGAAG  
  
 E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P C T F -

ES 2 677 245 T3

```

GGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CCGGTTCCTGTGCTGACCTCTAATTTGCTTGACACCGACGTGGTAGACAGAAGTAGAAG

G Q G T R L E I K R T V A A P S V F I F -
CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GGCGGTAGACTACTCGTCAACTTTAGACCTTGACGGAGACAACACACGGACGACTTATTG

P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N -
TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AAGATAGGGTCTCTCCGGTTTCATGTCACTTCCACCTATTGCGGGAGGTTAGCCCATTG

F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N -
TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
AGGGTCCTCTCACAGTGTCTCGTCTGCTCGTTCCCTGTCGTGGATGTCCGGAGTCTGTCGTGG

S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T -
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GACTGCGACTCGTTTCGTCTGATGCTCTTTGTGTTTCAGATGCGGACGCTTCAGTGGGTA

L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H -
CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 711
#223 GTCCCGGACTCGAGCGGGCAGTGTTCCTCGAAGTTGTCCCTCTCACAATC

Q G L S S P V T K S F N R G E C * -

```

Tabla 11: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena pesada

La secuencia de aminoácidos que codifica el dominio variable se coloca en negrilla y se subraya. Se indican los cebadores de oligonucleótido utilizados para clonación y secuenciación.

ES 2 677 245 T3

**MV416** ACCATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTTGCTATTTTAGAAGGTGTCCACTGT  
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60  
TGGTACCTTAACCCCGACTCGACCCAAAAGGAACAACGATAAAAATCTTCCACAGGTGACA

T M E L G L S W V F L V A I L E G V H C -

**MV418** GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTC  
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120  
CTCCACGTCAACCACCTCAGACCCCTCCGAACCAGGTCCGACCCCCAGGGACTCTGAG

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L -

TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAACTATTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCT  
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180  
AGGACACGTCCGAGACCTAAGTGGAAATCATTGATAACCTACTTGACCCAGGCGGTCCGA

S C A A S G F T F S N Y W M N W V R Q A -

ES 2 677 245 T3

CCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCGCCATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTAT  
 181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240  
 GGTCCCTTTCCCGACCTCACCCACCGCGGTATTTGGTTCTACCTTCACTCTTTATGATA  
  
P G K G L E W V A A I N Q D G S E K Y Y -  
 GTGGGCTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTAT  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300  
 CACCCGAGACACTTCCCGGCTAAGTGGTAGAGGTCTCTGTTGCGGTTCTTGAGTGACATA  
  
V G S V K G R F T I S R D N A K N S L Y -  
**MV432** CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTTCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGGGACTAT  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360  
 GACGTTTACTTGTGCGGACTCTCAGCTCCTGTGCCGACACATAATGACACACTCCCTGATA  
  
L O M N S L R V E D T A V Y Y C V R D Y -  
 TACGATATTTTGACCGATTATTACATCCACTATTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGC  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420  
 ATGCTATAAAAACGGCTAATAATGTAGGTGATAACCATGAAGCTAGAGACCCCGGCACCG  
  
Y D I L T D Y Y I H Y W Y F D L W G R G -  
**MV433** ACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC  
 421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480  
**MV434** TGGGACCAGTGACAGAGGAGTGGGAGGTGGTTCCCGGGTAGCCAGAAAGGGGACCGTGGG  
  
T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P -  
 TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC  
 481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540  
 AGGAGGTTCTCGTGAGACCCCGTGTGCGCCGGGACCCGACGGACCAGTTCCTGATGAAG  
  
 S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F -  
  
 CCGGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACTTC  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600  
 GGGCTTGGCCACTGCCACAGCACCTTGTAGTCCGCGGGACTGGTCCGCGCACGTGTGGAAG  
  
 P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F -  
 CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660  
 GGCCGACAGGATGTCAGGAGTCTGAGATGAGGGAGTTCGTGCGCACCCTGGCACGGGAGG  
  
 P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S -  
 AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGCCAGCAACACCAAG  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720  
**MV435** TCGTTCGAACCCGTGGGTCTGGATGTAGACGTTGCACCTAGTGTTCGGGTCGTTGTGGTTT  
  
 S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K -  
 GTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780  
**#265** CACCTGTCTCTCAACTCGGGTTTAGAACACTGTTTTGAGTGTGTACGGGTGGCACGGGT  
  
 V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P -

TAA

781 --- 783

ATT

\*

**Ejemplo 4:** Estructura tridimensional del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal IL-17 anti humano AIN457

Con el fin de determinar la conformación de las Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR) y la estructura del sitio de unión a antígeno de AIN457, se genera el fragmento Fab, se cristaliza y se determina su estructura de rayos X mediante cristalografía de proteína.

Método: El fragmento Fab de NVP-AIN457 se produce mediante división de papaína del anticuerpo completo y purificado mediante cromatografía de proteína A seguido por cromatografía de exclusión de tamaño. El material purificado luego se concentra mediante ultrafiltración a 20 mg/ml en 10mM de Tris-HCl pH 7.4, 25mM de NaCl, 5mM de TCEP. Los cristales se hacen crecer mediante la técnica de difusión de vapor en gotas que cuelgan a 19°C, de sulfato de amonio al 2.0M, 5% de PEG 400, 0.1M Na de MES pH 6.5. Ellas están en un grupo de espacios P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> con dimensiones celulares unitarias a=90.3Å, b=106.7Å, c=131.4Å y 2 moléculas Fab por unidad asimétrica. Antes de la recolección de datos de rayos X, se entrecruza un cristal único de AIN457 con glutaraldehído utilizando el método de Lusty (J. Appl. Cryst. (1999) 32, 106-112) y luego se transfiere a una solución que contiene 2.0M de Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% de PEG 400, y 0.1M Na de MES pH 6.5. El cristal se monta posteriormente en un criobucle y se congela instantáneamente para la recolección de datos a 95K. Se registran cada una de las imágenes de difracción 180 que corresponden a 1.0 gra de oscilación. Los datos de difracción se procesan con la suite de programa HKL. La estructura se determina en resolución 2.5Å mediante reemplazo molecular. La estructura luego se refina mediante dinámicas de ángulo de torsión y minimización de energía utilizando el programa CNX.

Resultados: Se presentan dos moléculas Fab AIN457 en la unidad asimétrica del cristal, con el bucle H-CDR3 de ambas moléculas Fab involucradas en los contactos de proteína-proteína en el bucle H-CDR3 de los Fab de simetría relacionada. Las dos moléculas Fab muestran diferentes ángulos de codo pero tienen de otra forma conformaciones de bucle CDR esencialmente idénticas (véase tabla 12 para la secuencia de aminoácidos de los bucles CDR). El bucle H-CDR1 adopta la estructura canónica H1:1 esperada, aunque la conformación del bucle H-CDR2 coincide con aquel de la estructura canónica H2:3A. El bucle H-CDR3 del anticuerpo AIN457 es excepcionalmente largo, comprende 18 residuos entre las posiciones 94 de Kabat (Arg H98) y 101 (Asp H115). Esta muestra la estructura de tronco hinchado típica estabilizada mediante un puente de sal entre la cadena lateral Arg en la posición 94 (Arg H98) y el grupo carboxilato Asp en la posición H101 (Asp H115), y mediante una interacción unida a H entre la cadena lateral de Trp H117 y el grupo carbonilo de cadena principal de Phe H114. La cabeza del bucle H-CDR3 tiene la estructura de una horquilla beta trenzada larga con un segundo hinchamiento beta en su base y un giro beta tipo l' en su ápice. Una característica notable del bucle H-CDR3 AIN457 es su muy alto contenido en los residuos aromáticos: 6 tirosinas, 2 triptofanos, 1 fenilalanina. Debido a que todos los otros bucles CDR contribuyen a 1 tirosina más cada una, el sitio de combinación de antígeno de AIN457 posee 11 tirosinas en total. Las conformaciones de los bucles L-CDR1 y L-CDR2 corresponden a las estructuras canónicas L1:6 y L2:1, respectivamente. En contraste a H-CDR3, el bucle L-CDR3 es corto (6 residuos) y muestra la estructura canónica comúnmente observada L3:1, con una cis-prolina en su punta (Pro L96), una glutamina en la posición 90 de Kabat (Gln L91) y una treonina en la posición 97 de Kabat (Thr L98). Sin embargo, una característica muy inusual del bucle L-CDR3 AIN457 es la presencia de un residuo cisteína después del cis-prolina (Cys L97). La cadena lateral de Cys L97 está en la parte inferior de una depresión poco profunda ubicada en la interfaz V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> y alineada por los residuos Trp H112, Trp H47 y Tyr L92.

Tabla 12:

Cadena ligera		
o L-CDR1	Definición de Kabat	R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A
	Definición de Chothia/rayos x	R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A
o L-CDR2	Definición de Kabat	G-A-S-S-R-A-T
	Definición de Chothia/rayos X	G-A-S-S-R-A-T
o L-CDR3	Definición de Kabat	Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T

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

Tabla 1: Las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de los anticuerpos monoclonales AIN457, con base en la definición de Kabat y como se determina por el análisis de rayos X, utilizando el método de Chothia y colaboradores. Los aminoácidos resaltados en negrilla son parte de los bucles CDR, mientras que aquellos mostrados en el estilo plano son parte de la estructura del anticuerpo.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> Compuesto Orgánico

<130> 4-33392P1

10 <160> 23

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

15 <213> artificial

<220>

<223> región CDR1 de AIN457

<220>

<221> DOMINIO

20 <222> (1) .. (5)

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

<400> 1

**Asn Tyr Trp Met Asn**

**1**

**5**

<210> 2

25 <211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR2 de AIN457

<220>

5 <221> DOMINIO

<222> (1)..(17)

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

<400> 2

**Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

10 <210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15 <223> CDR3 de AIN457

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (18)

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

20 <400> 3

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

**Asp Leu**

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

25 <213> artificial

<220>

<223> CDR1' de AIN457

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (12)

<223> CDR1' = región hipervariable 1 de cadena ligera de AIN457

<400> 4

**Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala**

**1 5 10**

5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> CDR2' de AIN457

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (7)

15

<223> CDR2' = región hipervariable 2 de cadena ligera AIN457

<400> 5

**Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr**

**1 5**

<210> 6

<211> 9

20

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR3' de AIN457

<220>

25

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (9)

<223> CDR3' = región hipervariable 3 de cadena ligera AIN457

<400> 6

**Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Cys Thr**

**1 5**

30

<210> 7

<211> 381



ES 2 677 245 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(381)

<223> ADN del dominio de cadena pesada de AIN457

<400> 7

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

**48**

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

**1 5 10 15**

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

**96**

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

**20 25 30**

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

**144**

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

**35 40 45**

ES 2 677 245 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 8

<211> 127

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

```

1           5           10          15

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 9

<211> 327

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

ES 2 677 245 T3

<223> ADN de la parte variable de cadena ligera de AIN457

<400> 9

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg  
48

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

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc  
96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
                  20                    25                    30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc  
144

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
                  35                    40                    45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt  
192

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
                  50                    55                    60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag  
240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65                    70                    75                    80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg  
288

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
                  85                    90                    95

tgc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cga  
327

Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
                  100                    105

5 <210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 677 245 T3

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
                  20                    25                    30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
                  35                    40                    45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50                    55                    60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65                    70                    75                    80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro  
                  85                    90                    95

Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
                  100                    105

<210> 11

5 <211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR1-x de AIN457

10 <220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (10)

<223> CDR1-x = dominio hipervariable x de la cadena pesada de AIN457

<400> 11

**Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn**  
**1 5 10**

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> CDR2-x de AIN457

<220>

<221> dominio

10 <222> (1) .. (11)

<223> CDR2-x = dominio hipervariable de cadena pesada x de AIN457

<400> 12

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

<210> 13

15 <211> 23

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR3-x de AIN457

20 <220>

<221> dominio

<222> (1)..(23)

<223> CDR3-x = dominio hipervariable x de cadena pesada AIN457

<400> 13

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

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

25

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>  
 <223> Cebador para clonación de la cadena pesada de AIN457  
 <220>  
 <221> primer±bind  
 5 <222> (1) .. (20)  
 <223> MV432  
 <400> 14  
**gactattacg atatattgac**  
**20**

<210> 15  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> cebador para clonación de la cadena pesada de AIN457  
 15 <220>  
 <221> primer±bind  
 <222> (1) .. (20)  
 <223> MV433  
 <400> 15  
**gcctccacca agggcccatc**  
**20**

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 25 <220>  
 <223> cebador para clonación de la cadena pesada de AIN457  
 <220>  
 <221> primer±bind  
 <222> (1) .. (20)  
 30 <223> MV434  
 <400> 16  
**tggttcccgg gtagccagaa**  
**20**

- <210> 17  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> artificial
- 5 <220>  
<223> cebador para clonación de la cadena pesada de AIN457  
<220>  
<221> primer±bind  
<222> (1) .. (20)
- 10 <223> MV435  
<400> 17  
**ccacctgttc tctcaactcg**  
**20**
- <210> 18  
<211> 24
- 15 <212> ADN  
<213> artificial  
<220>  
<223> PCR de cadena pesada AIN457  
<220>
- 20 <221> primer±bind  
<222> (1) .. (24)  
<223> MV416  
<400> 18  
**accatggaat tggggctgag ctgg**  
**24**
- 25 <210> 19  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> artificial  
<220>
- 30 <223> PCR de cadena pesada AIN457  
<220>  
<221> primer±bind  
<222> (1) .. (26)  
<223> #265



<400> 19

**gagtgtgtac gggtaggcacg ggtatt**  
**26**

<210> 20

<211> 21

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> PCR de cadena pesada AIN457

<220>

10 <221> primer±bind

<222> (1) .. (21)

<223> MV418

<400> 20

**gaggtgcagt tggtaggagtc t**  
**21**

15 <210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> artificial

<220>

20 <223> PCR de cadena ligera AIN457

<220>

<221> primer±bind

<222> (1) .. (24)

<223> MV417

25 <400> 21

**accatggaaa ccccagcggg gctt**  
**24**

<210> 22

<211> 22

<212> ADN

30 <213> artificial

<220>

<223> PCR de cadena ligera AIN457

<220>

# ES 2 677 245 T3

<221> primer±bind

<222> (1) .. (22)

<223> #223

<400> 22

**gaagttgtcc cctctcacia tc**

**22**

5

<210> 23

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

10

<220>

<223> PCR de cadena ligera AIN457

<220>

<221> primer±bind

<222> (1) .. (21)

15

<223> MV419

<400> 23

**gaaattgtgt tgacgcagtc t**

**21**

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo de unión a IL-17 o fragmento del mismo que comprende dominios variables tanto de cadena pesada (V<sub>H</sub>) como de cadena ligera (V<sub>L</sub>) para uso en el tratamiento de una artritis inflamatoria, en donde dicho anticuerpo de unión a IL-17 o fragmento del mismo comprende al menos un sitio de unión a antígeno que comprende:
- 5 (a) un V<sub>H</sub> que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, en donde las regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Kabat; o
- 10 (b) un V<sub>H</sub> que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, teniendo dicha CDR1-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11, teniendo dicha CDR2-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:12, y teniendo dicha CDR3-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13, en donde las regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Chothia; y
- 15 (c) un V<sub>L</sub> que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6 en donde las regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Kabat.
2. El anticuerpo de unión a IL-17 o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo humano.
- 20 3. El anticuerpo de unión a IL-17 o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende al menos un sitio de unión a antígeno que comprende:
- a. un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO:8 comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 127; o
- 25 b. un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:8 comenzando con aminoácido en la posición 1 y terminando con aminoácido en la posición 127 y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO:9, comenzando con aminoácido en la posición 1 y terminando con aminoácido en la posición 109.
4. El anticuerpo de unión a IL-17 o fragmento del mismo para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que es un anticuerpo IgG1/K humano que comprende:
- 30 (a) una cadena ligera que consiste en los residuos de aminoácidos que comienzan en el residuo +1 en la Tabla 10
- E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S  
S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D  
R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y  
G S S P C T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V F I F P P S D  
E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D  
N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S  
K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G  
E C ;
- y
- (b) una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácidos que comienzan en el residuo +1 en la Tabla 11

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

5. Uso de un anticuerpo de unión a IL-17 o fragmento del mismo que comprende tanto dominios variables de cadena pesada (V<sub>H</sub>) como de cadena ligera (V<sub>L</sub>), para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de espondilitis anquilosante, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a IL-17 comprende al menos un sitio de unión a antígeno que comprende:

- (a) un V<sub>H</sub> que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3, en donde las regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Kabat; o
- 10 (b) un V<sub>H</sub> que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, teniendo dicha CDR1-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:11, teniendo dicha CDR2-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:12, y teniendo dicha CDR3-x la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:13, en donde las regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Chothia; y
- 15 (c) un V<sub>L</sub> que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6 en donde las regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Kabat.

6. Uso de un anticuerpo de unión a IL-17 o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1/K humano que comprende:

- 20 (a) una cadena ligera que consiste en los residuos de aminoácidos que comienzan en el residuo +1 de la Tabla 10

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

y

- (b) una cadena pesada que comprende los residuos de aminoácidos que comienzan en el residuo +1 en la Tabla 11

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

ES 2 677 245 T3

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

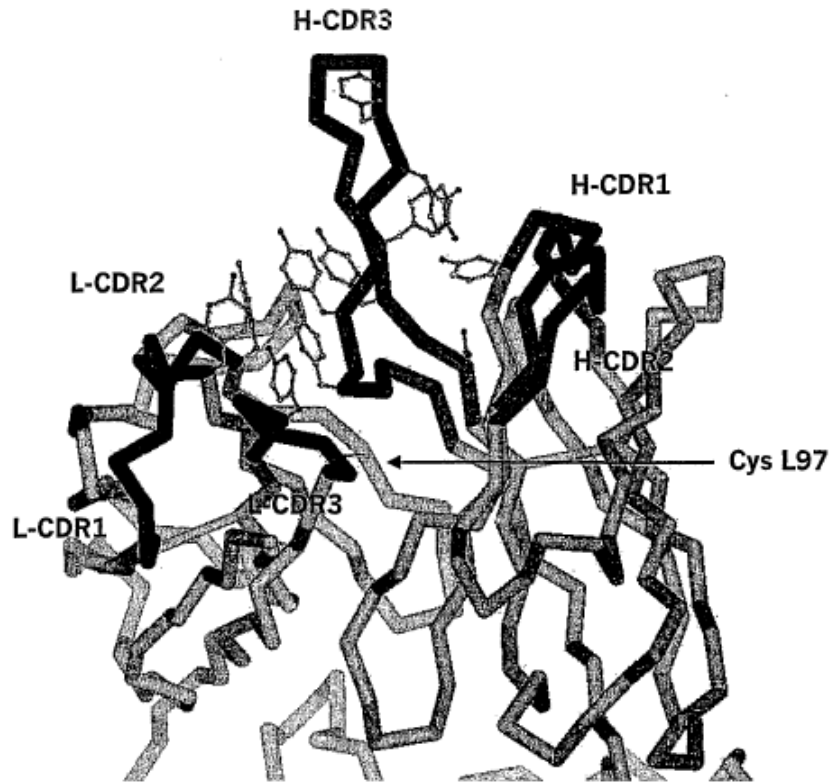
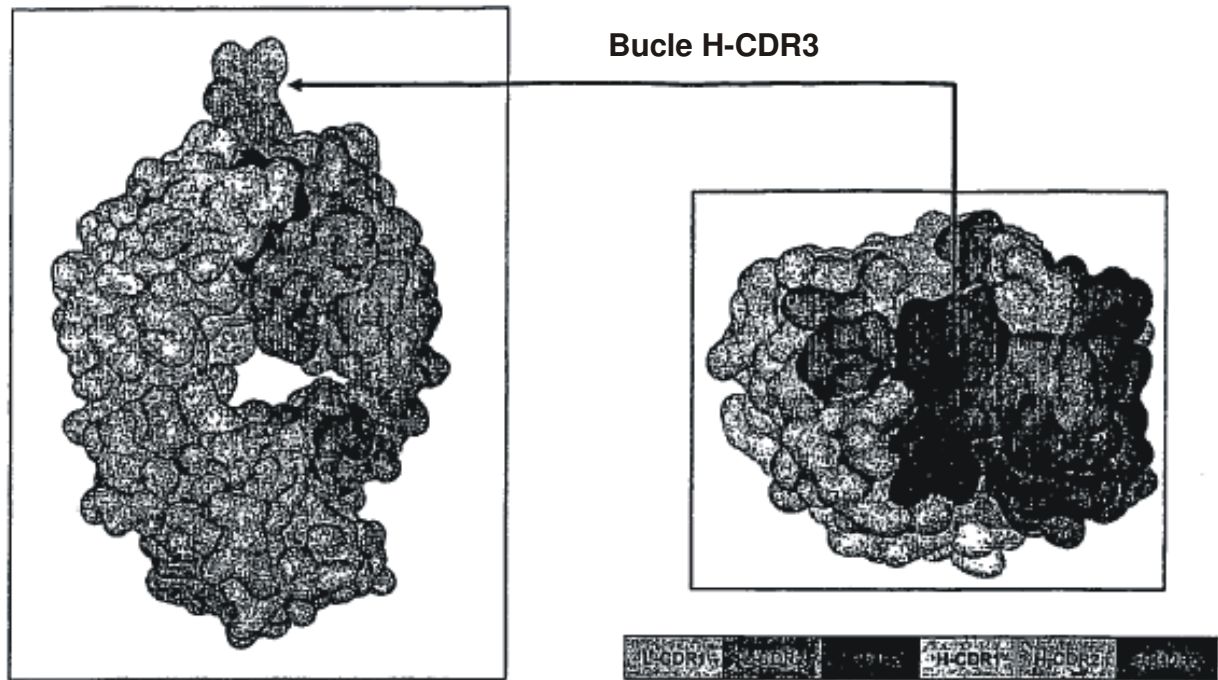


Figura 1. Estructura de rayos X de Fab AIN457

Vista de cerca de los dominios variables del Fab AIN457 (traza C) con las regiones de determinación de complementariedad resaltadas. Se muestran todas las cadenas laterales de tirosina contribuidas por los bucles de CDR, para ilustrar el hecho de que el sitio de combinación con antígeno de AIN457 es excepcionalmente rico en residuos de tirosina. También se muestran (flecha) las cadenas laterales de Cys L97, en la interfaz VL-VH



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

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