

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 253**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2012 PCT/GB2012/000014**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.07.2012 WO12093254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2012 E 12700417 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2661627**

54 Título: **Lipocalina 2 como biomarcador para la eficacia de la terapia con inhibidores de IL-17**

30 Prioridad:

07.01.2011 GB 201100282

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

23.10.2019

73 Titular/es:

UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)

Allée de la Recherche 60

1070 Brussels, BE

72 Inventor/es:

PLATT, ADAM SAMUEL;

RAPECKI, STEPHEN EDWARD;

FORTUNATO, MARA;

RUNDLE, JON LEIGH;

SMITH, PAUL ALFRED y

WATT, GILLIAN SAIRFULL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 728 253 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).

DESCRIPCION

Lipocalina 2 como biomarcador para la eficacia de la terapia con inhibidores de IL-17

La presente invención se refiere de un modo general al uso de lipocalina 2 como biomarcador para enfermedades mediadas por IL-17 y para controlar la respuesta de un paciente a la terapia con anti-IL-17.

5 La interleucina 17 (IL-17), también conocida como CTLA-8 o IL-17A, es una citoquina proinflamatoria que estimula la secreción de una amplia gama de otras citoquinas de varias células no inmunitarias. IL-17 es capaz de inducir la secreción de IL-6, IL-8, PGE2, MCP-1 y G-CSF por células adherentes como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales y endoteliales, y también es capaz de inducir la expresión de superficie de ICAM-1, proliferación de células T y crecimiento y diferenciación de progenitores humanos CD34+ en neutrófilos cuando se co-cultivan en presencia de fibroblastos irradiados (Fossiez et al., 1998, Int. Rev. Immunol. 16, 541 - 551). La IL-17 se produce predominantemente por células T de memoria activadas y actúa uniéndose a un receptor de superficie celular distribuido ubicuamente (IL-17R) (Yao et al., 1997, Cytokine, 9, 794 - 800). También puede actuar a través de la unión a un complejo de IL-17RA e IL-17RC (Toy et al., 2006, J. Immunol. 177 (11); 36 - 39). Se han identificado varios homólogos de IL-17 que tienen papeles tanto similares como distintos en la regulación de las respuestas inflamatorias. Para una revisión de las familias de citoquinas/receptores de IL-17, véase Dumont, 2003, Expert Opin. Ther. Patents, 13, 287 - 303.

El homólogo más estrechamente relacionado es IL-17F (ML-1), que comparte aproximadamente un 55% de homología de la secuencia de aminoácidos con IL-17A (Moseley et al., 2003, Cytokine Growth Factor Rev. 14: 155 - 174). IL-17A e IL-17F se expresan mediante el subconjunto relacionado autoinmunitario recientemente definido de células T auxiliares, Th17, que también expresan las citoquinas de señalización IL-21 e IL-22 (Korn et al., 2009, Annu. Rev. Immunol. 27: 485 - 517.: 485 - 517). IL-17A e IL-17F se expresan como homodímeros, pero también pueden expresarse como el heterodímero IL-17A/F (Wright et al. 2008, J. Immunol. 181: 2799 - 2805). La señal de IL-17A y F a través de los receptores IL-17R, IL-17RC o un complejo receptor IL-17RA/RC (Gaffen 2008, Cytokine. 43: 402 - 407). Tanto la IL-17A como la IL-17F se han asociado con una serie de enfermedades autoinmunitarias.

La IL-17 puede contribuir a una serie de enfermedades mediadas por respuestas inmunes anormales, como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la inflamación de las vías respiratorias, así como el rechazo de trasplantes de órganos y la inmunidad antitumoral. Los inhibidores de la actividad de IL-17 son bien conocidos en la técnica; por ejemplo, se utilizó una proteína de fusión IL-17R:Fc para demostrar el papel de la IL-17 en la artritis inducida por colágeno (Lubberts et al., J. Immunol. 2001, 167, 1004 - 1013), se han utilizado anticuerpos policlonales neutralizantes para reducir la formación de adherencias peritoneales (Chung et al., 2002, J. Exp. Med., 195, 1471 - 1478) y se usó un anticuerpo neutralizante para IL-17 para demostrar el papel de la IL-17 en la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental, un modelo murino de MS (documento WO2005/051422). Se han descrito numerosos anticuerpos anti-IL-17A neutralizantes, véanse, por ejemplo, los descritos en los documentos WO2006/054059, WO2006/013107, WO2007070750 y WO2007149032. También se han descrito los anticuerpos que se unen tanto a IL-17A como a IL-17F; véanse, por ejemplo, los documentos WO2007/106769, WO2008/047134, WO2009/136286 y WO2010/025400.

El papel de los biomarcadores se va haciendo cada vez más importante en el desarrollo clínico de los agentes terapéuticos. Un biomarcador puede ser un indicador de procesos biológicos normales, de procesos patológicos o de respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Su papel varía desde la estratificación de la población de pacientes para ayudar a identificar a los pacientes que responden frente a los que no responden, hasta la determinación de la dosis y la eficacia del agente terapéutico. En consecuencia, los biomarcadores pueden ser herramientas valiosas para tomar mejores decisiones que reducirán el costo del desarrollo de medicamentos y las terapias dirigidas a la población de pacientes más adecuada.

Las lipocalinas son pequeñas proteínas secretadas con una estructura terciaria común que se une a moléculas lipófilas como las prostaglandinas y el colesterol, y se sabe que algunas son biomarcadores de ciertas enfermedades (Xu y Venge, 2000, Biochimica et Biophysica Acta, 1482, 298 - 307). Una de estas lipocalinas es la lipocalina 2 (LCN2), también conocida como 24p3 o lipocalina asociada a gelatinasa neutrófila (NGAL), que es una glucoproteína secretora de 25 kDa que se identificó originalmente en las células renales de ratón y los gránulos neutrófilos humanos. Se ha demostrado que LCN2 es un biomarcador para la detección precoz de diversas lesiones renales, obesidad y cáncer (véase, por ejemplo, Devarajan, 2007, Contributions to Nephrology, 156, 203 - 212; Wang et al., 2007, Clinical Chemistry, 53, 34 - 41; Ratana et al, 2007, International Journal of Cancer, 120 (11), 2426 - 34). Se ha demostrado que la expresión del gen LCN2 está regulada al alza en la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, un modelo murino de MS (Jelinsky et al., 2005, Journal of Neurological Sciences, 239, 81 - 93). Se ha demostrado que IL-17 está involucrada en la regulación transcripcional de LCN2 *in vitro* a través de NF-κB y C/EBP (Shen et al., 2006, Journal of Biological Chemistry, 281, 34, 24138 - 24148; Shen et al. , 2005, Journal of Leukocyte Biology, 77, 388 - 399). Se desconoce si IL-17 regula LCN2 *in vivo*.

La presente invención demuestra que LCN2 puede servir como biomarcador para enfermedades mediadas por IL-17 y para la terapia anti-IL-17. Específicamente, los autores de la presente invención han podido demostrar que un anticuerpo neutralizante anti-IL-17 reduce la expresión de LCN2 en un modelo animal de MS. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un método para controlar la respuesta a un medicamento de un sujeto

que padece un trastorno mediado por IL-17 o asociado con un aumento del nivel de IL-17, que comprende un inhibidor de IL-17, en donde el nivel de expresión de lipocalina 2 en una muestra de ensayo de un fluido corporal o tejido obtenido del sujeto se evalúa antes y después de la administración de dicho medicamento, y en donde el nivel de expresión de lipocalina 2 después de la administración del medicamento se compara con el nivel de expresión de lipocalina 2 antes de la administración del medicamento con el fin de determinar la eficacia de la terapia inhibidora anti-IL-17, en donde un descenso del nivel de expresión de lipocalina 2 es indicativo de una reducción del nivel de IL-17 o efectos fisiológicos relacionados con IL-17 y en donde en donde el inhibidor IL-17 es un anticuerpo anti-IL-17.

En la presente solicitud, el uso del término "IL-17", como se describe anteriormente en el presente texto, se refiere a la proteína también conocida como CTLA-8 o IL-17A.

En el método de la presente invención, el nivel de expresión de LCN2 se puede medir en cualquier muestra de ensayo adecuada de un fluido corporal o tejido obtenido del sujeto. Las muestras de ensayo adecuadas incluyen, entre otras, sangre, suero, plasma, orina, biopsia de tejido, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo y líquido de lavado broncoalveolar (BAL).

Los métodos adecuados para determinar el nivel de expresión de LCN2 en una muestra de ensayo son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, inmunoensayos, electroforesis en gel seguida de visualización, detección de ARNm o medida de la actividad de LCN2 (por ejemplo, transporte de hierro, véase por ejemplo Schmidt-Ott y otros, J. Am. Soc. Nephrol. 2007, 18 (2) 407 - 413).

En una realización, el nivel de expresión de LCN2 se determina midiendo el nivel de polipéptido LCN2 en una muestra de ensayo.

En una realización, la etapa de detección del nivel de expresión del polipéptido LCN2 comprende:

(a) poner en contacto la muestra de ensayo con un reactivo de captura que es específico para un polipéptido LCN2; y

(b) detectar si ha tenido lugar la unión entre el reactivo de captura y dicho polipéptido LCN2 en la muestra.

En un aspecto, el polipéptido LCN2 capturado se detecta usando un reactivo de detección marcado directa o indirectamente, que puede inmovilizarse en una fase sólida. Un medio conveniente para detectar o cuantificar un polipéptido LCN2 implica el uso de anticuerpos. El polipéptido LCN2 se puede detectar por medio de cualquier inmunoensayo conocido en la técnica, que incluye, sin ser limitante, inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de poliácridamida con dodecilsulfato sódico, electroforesis en gel bidimensional, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

La detección de la interacción de un anticuerpo con LCN2 puede facilitarse acoplado el anticuerpo a una sustancia detectable, por ejemplo, pero sin ser limitante, una enzima (como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa, la acetilcolinesterasa), un grupo prostético (tal como estreptavidina, avidina, biotina), un material fluorescente (como la umbeliferona, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la diclorotriazinilamina fluoresceína, el cloruro de dansilo, la ficoeritrina), un material luminiscente (tal como el luminol), un material bioluminiscente (tal como la luciferasa, luciferina, aequorina), un nucleido radiactivo (tal como ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ⁹⁹Tc), un metal emisor de positrones o un ion metálico paramagnético no radiactivo (véase el documento US 4.741.900).

En Xu et al., 1994, Journal of Immunological Methods, 171, 2, 245 - 252 y Flo et al., 2004, Nature 432, 917 - 921 se describen ejemplos de ensayos adecuados para la detección de LCN2.

También será evidente para un experto en la técnica que puede determinarse el nivel de expresión de LCN2 midiendo el nivel de un ácido nucleico de LCN2, preferiblemente ARNm.

La detección de ácido nucleico puede conseguirse utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ensayos de hibridación, matrices de sondas de captura (ARNm o ADNc), amplificación, p. ej. PCR, RT-PCR (véanse, por ejemplo, los métodos descritos en el documento WO2006/125105).

En la presente invención, la respuesta de un sujeto a un medicamento que comprende un inhibidor de IL-17 es monitorizada midiendo el nivel de expresión de LCN2 en muestras de ensayo obtenidas del sujeto de ensayo antes y después de la administración de dicho medicamento. Preferiblemente, el nivel de expresión de LCN2 se mide en muestras tomadas en intervalos de tiempo sucesivos después de la administración del medicamento. Por ejemplo, la expresión de LCN2 se puede determinar una o más veces después de la administración del medicamento, por ejemplo en el curso de la terapia, por ejemplo en el curso de una, dos, cuatro, seis semanas, seis meses o más, después de iniciar un régimen terapéutico.

En una realización de la presente invención, se comparan los niveles de expresión de lipocalina 2 en el sujeto antes y después de la administración de un medicamento que comprende un inhibidor de IL-17, para determinar la eficacia del medicamento, en donde el inhibidor es un anticuerpo anti-IL-17. Una disminución en el nivel de expresión de lipocalina 2 detectado utilizando el método de la presente invención es indicativa de una reducción del nivel de IL-17 o efectos fisiológicos relacionados con IL-17. En una realización, por consiguiente, el nivel de expresión de LCN2 se reduce en respuesta al tratamiento con un anticuerpo anti-IL-17.

En la presente invención, el sujeto puede padecer cualquier trastorno mediado por IL-17 o asociado con un nivel elevado de IL-17, tal como un trastorno autoinmunitario, inflamatorio y/o neurológico. Preferiblemente, la condición patológica se selecciona entre el grupo que consiste en infecciones (virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias), shock endotóxico asociado con infección, artritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, coleciostopatía, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, ictus, diabetes tipo I, artritis de Lyme, meningoencefalitis, trastornos inflamatorios inmunomediados del sistema nervioso central y periférico, tales como esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso y síndrome de Guillain-Barré, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplantes, cáncer (tanto tumores sólidos como melanomas, hepatoblastomas, sarcomas, carcinomas de células escamosas, cáncer celular transicional, cáncer de ovario y neoplasias hematológicas y, en particular, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, cáncer gástrico y cáncer de colon), enfermedades cardíacas incluyendo enfermedades isquémicas como el infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipocloremia. En una realización, el sujeto padece un trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil de aparición sistémica (JIA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, asma, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis atópica, esclerodermia, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías.

En una realización, el trastorno es esclerosis múltiple.

En una realización, el trastorno es artritis reumatoide.

En una realización, el trastorno es una enfermedad inflamatoria del intestino.

En una realización, el trastorno es la enfermedad de Crohn.

En una realización, el trastorno es colitis ulcerosa.

Un inhibidor de la actividad de IL-17 de acuerdo con la presente invención es un agente que interfiere con la actividad de IL-17. El término "actividad de IL-17" como se usa en el presente documento se refiere al espectro de actividad que se entiende en la técnica para IL-17, por ejemplo la inducción de la secreción de IL-6 a partir de fibroblastos por IL-17 (Yao et al., 1995, *Journal of Immunology*, 155, 5483 - 5486). Los inhibidores de acuerdo con la presente invención pueden inhibir parcial o completamente la actividad de IL-17. Los ejemplos de inhibidores incluyen, sin ser limitantes, inhibidores que son capaces de interactuar (por ejemplo, unirse a, o reconocer) con IL-17 o un receptor de IL-17 (IL-17RA o IL-17RC), o una molécula de ácido nucleico que codifica IL-17 o IL-17R, o son capaces de inhibir la expresión de IL-17 o IL-17R o son capaces de inhibir la interacción entre IL-17 e IL-17R. Tales inhibidores pueden ser, sin limitación, anticuerpos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, ARN antisentido y ARNsi), carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos.

Los ejemplos de inhibidores adecuados incluyen un anticuerpo que se une a IL-17.

Se apreciará que el inhibidor de IL-17 para uso en la presente invención se puede utilizar solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, y en el caso de un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo, se puede incorporar en otros formatos de anticuerpo, en particular formatos de anticuerpo multiespecíficos, tales como formatos de anticuerpos bi o tri específicos, en los que el anticuerpo de la presente invención proporciona una especificidad, es decir, un inhibidor de la actividad de IL-17A. Los ejemplos de formatos de anticuerpos multiespecíficos incluyen anticuerpos bi, tri o tetravalentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, bicuerpos y tricuerpos (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech* 23 (9): 1126 - 1136; Schoonjans et al. 2001, *Biomolecular Engineering*, 17 (6), 193 - 202). Otros formatos de anticuerpos multiespecíficos incluyen fragmentos Fab-Fv, Fab-dsFv, Fab-Fv-Fv, Fab-Fv-Fc y Fab-dsFv-PEG, descritos en los documentos WO2009040562, WO2010035012, WO2011/08609, WO2011/030107 y WO2011/061492, respectivamente.

Los inhibidores de la actividad de IL-17 son bien conocidos en la técnica ya que son métodos para identificar y producir tales inhibidores. Los ejemplos incluyen las proteínas de fusión IL-17R:Fc e IL17RC-Fc (Lubberts et al., *J. Immunol.* 2001, 167, 1004 - 1013; Kuestner et al., *J. Immunol.* 2007, 179, 5462 - 5473 y WO2002058717) y anticuerpos neutralizantes (Chung et al., 2002, *J. Exp. Med.*, 195, 1471 - 1478; Ferretti, 2003, *Journal of Immunology*, 170, 2106 - 2112; WO2006/054059, WO2006/013107, WO2007070750 y WO07149032). Los inhibidores de la actividad de IL-17 adecuados incluyen también anticuerpos IL-17A/F, es decir, anticuerpos que se unen tanto a IL-17A como a IL-17F, por ejemplo los descritos en los documentos WO2007/106769, WO2008/ 047134, WO2009/136286 y

WO2010/025400.

Un inhibidor de IL-17 para uso en la presente invención es un anticuerpo que interactúa (es decir, se une o reconoce) con IL-17 o uno o ambos de sus receptores e inhibe la actividad de IL-17.

5 En un ejemplo, tales anticuerpos interactúan selectivamente con IL-17. "Interactuar selectivamente con" (por ejemplo, el reconocimiento o la "unión a") significa que los anticuerpos tienen una mayor afinidad por los polipéptidos IL-17 que por otros polipéptidos. Ejemplos de anticuerpos adecuados son aquellos que inhiben la actividad de IL-17 uniéndose a IL-17 de tal manera que evite que sea biológicamente activa, por ejemplo impidiendo la unión de IL-17 a su receptor.

10 En otro ejemplo, los anticuerpos interactúan selectivamente con IL-17A e IL-17F. La "interacción selectiva con" (por ejemplo, el reconocimiento o la unión a) significa que los anticuerpos tienen una afinidad por los polipéptidos IL-17A e IL-17F mayor que por otros polipéptidos. Ejemplos de anticuerpos adecuados son aquellos que inhiben la actividad de IL-17 uniéndose a IL-17 de tal manera que se evite que sea biológicamente activa, por ejemplo evitando la unión de IL-17 a su receptor.

Así pues, en una realización el medicamento que comprende un inhibidor de IL-17 para su uso en la presente invención comprende un anticuerpo anti-IL-17 o un fragmento del mismo funcionalmente activo.

15 Los polipéptidos IL-17 o las células que expresan dichos polipéptidos IL-17 se pueden usar para producir anticuerpos que específicamente reconocen dichos polipéptidos. Los polipéptidos IL-17 pueden ser polipéptidos "maduros" o fragmentos biológicamente activos o derivados de los mismos. Los polipéptidos IL-17 pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica a partir de células hospedadoras modificadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión o pueden recuperarse de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se usan indistintamente a menos que se especifique otra cosa. Los polipéptidos IL-17 pueden en algunos casos ser parte de una proteína más grande, como una proteína de fusión, por ejemplo fusionada con una etiqueta de afinidad. Los anticuerpos generados contra estos polipéptidos pueden obtenerse administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase por ejemplo el Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986. Pueden inmunizarse muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, gallinas, vacas o cerdos. Sin embargo, se prefieren generalmente los ratones, conejos, cerdos y ratas.

20

25

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica, como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256: 495 - 497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, Immunology Today, 4: 72) y la técnica de hibridoma-EBV (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp 77 - 96, Alan R Liss, Inc., 1985).

30

Los anticuerpos para ser usados en la invención pueden generarse también utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales mediante la clonación y expresión de ADNc de la región variable de la inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (15): 7843 - 7848 y en el documento WO92/02551.

35

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089). Los anticuerpos humanizados pueden además comprender opcionalmente uno o más residuos de marco derivados de la especie no humana a partir de la cual se derivaron las CDR.

40

Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que han sido diseñados genéticamente de forma que los genes de las cadenas ligeras y pesadas estén compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a especies diferentes. Pueden prepararse anticuerpos bivalentes por métodos conocidos en la técnica (Milstein et al., 1983, Nature 305: 537 - 539; WO 93/08829, Traunecker et al., 1991, EMBO J. 10: 3655 - 3659). Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, el documento WO 92/22853).

45

Los anticuerpos para uso en la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación de fago conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman et al. (en J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41 - 50), Ames et al. (J. Immunol. Methods, 1995, 184: 177 - 186), Kettleborough et al. (Eur. J. Immunol. 1994, 24: 952 - 958), Persic et al. (Gene, 1997 187 9 - 18), Burton et al. (Advances in Immunology, 1994, 57: 191 - 280) y los documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y los documentos US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108. Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena única, como las descritas en la patente de EE.UU. No. 4.946.778, puede también adaptarse para producir anticuerpos de cadena única contra los polipéptidos IL-17 o IL-17R. Además, los ratones transgénicos u otros organismos, incluidos otros mamíferos, pueden usarse para expresar anticuerpos humanizados.

50

55

Los anticuerpos anti-IL-17 para uso en la presente invención incluyen anticuerpos completos y fragmentos activos funcionalmente o derivados de los mismos y pueden ser, sin limitarse a ellos, anticuerpos policlonales, monoclonales, multivalentes, multiespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y fragmentos de unión con el epítipo de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión con el antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los fragmentos de anticuerpos y los métodos para producirlos son bien conocidos en la técnica; véase por ejemplo Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165 - 181. Los ejemplos particulares de fragmentos de anticuerpos para uso en la presente invención son fragmentos Fab' que poseen una región bisagra nativa o modificada. Ya se han descrito varias regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US 5.677.425, WO9915549 y WO9825971.

Si se desea, un anticuerpo para ser usado en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. El término "molécula efectora" como se usa en este documento incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionucleidos, particularmente radioyodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos reporteros tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopía de RMN o ESR. En un ejemplo, los anticuerpos anti-IL-17 pueden conjugarse con una molécula efectora, tal como un agente citotóxico, un radionucleido, un péptido o polipéptido, o un resto de fármaco para modificar una respuesta biológica dada. En otro ejemplo, la molécula efectora puede aumentar la vida mitad *in vivo* y/o disminuir la inmunogenicidad y/o mejorar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas incluyen polímeros y proteínas tales como albúmina y proteínas de unión a la albúmina. Los ejemplos de polímeros adecuados incluyen cualquier polímero sintético o de origen natural soluble en agua, sustancialmente no antigénico, que incluye, por ejemplo, polímeros polialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituida, polialquileno o polioxialquileno, o polisacáridos ramificados o no ramificados, por ejemplo, un homo- o hetero-polisacárido tal como lactosa, amilosa, dextrano o glucógeno. Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxi. Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol). Preferiblemente, el polímero es un poli(óxido de alquileno) tal como polietilenglicol (PEG).

En otro ejemplo, la presente invención proporciona un método para estratificar pacientes (es decir, seleccionar individuos con un diagnóstico probable de cáncer y/o un trastorno autoinmunitario y/o inflamatorio y/o neurológico o diagnosticado con cáncer y/o un trastorno autoinmunitario y/o trastorno inflamatorio y/o neurológico, para el tratamiento con un inhibidor de la IL-17) obteniendo mediciones del nivel de expresión de lipocalina 2 en una muestra de ensayo de tales pacientes. El nivel medido de lipocalina 2 se compara con un valor de referencia, tal como un sujeto, muestra o cohorte de referencia, por ejemplo, de un sujeto o población de sujetos "normales" o "saludables". En un ejemplo, el valor de referencia es el nivel promedio de lipocalina 2 determinado en una diversidad de muestras aisladas de individuos sanos. Los sujetos que exhiben niveles elevados de lipocalina 2 se consideran adecuados para el tratamiento con un inhibidor de IL-17.

La información así obtenida se puede usar para ayudar a la estratificación del diagnóstico (o diagnóstico probable) del individuo. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para seleccionar un paciente que tiene un trastorno mediado por IL-17 o asociado con un aumento del nivel de IL-17 adecuado para el tratamiento con un medicamento que comprende un inhibidor de IL-17, y tratar a dicho paciente con dicho medicamento, comprendiendo el método:

(1) comparar un nivel medido de la expresión de lipocalina 2 en una muestra de ensayo de un fluido corporal o tejido obtenido de dicho paciente con un valor de referencia para la expresión de lipocalina 2 y

(2) si es elevado en comparación con el valor de referencia, iniciar la terapia con un medicamento que comprende un inhibidor de IL-17 en donde el inhibidor de IL-17 es un anticuerpo anti-IL-17.

Del mismo modo, también se proporciona un inhibidor de IL-17 para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por IL-17 en la que el inhibidor de IL-17 es un anticuerpo anti-IL-17, el trastorno se selecciona entre el grupo consistente en artritis, artritis reumatoide, psoriasis, artritis soriásica, artritis idiopática juvenil de aparición sistémica (JIA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, asma, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis atópica, esclerodermia, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías, y el paciente se selecciona comparando el nivel de expresión de lipocalina 2 en una muestra de ensayo de un fluido corporal o tejido de dicho paciente, con un valor de referencia.

Los inhibidores de la actividad de IL-17 utilizados en el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad mediada por IL-17 se administrarán generalmente en forma de una composición farmacéutica que típicamente comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 El término "tratamiento" incluye terapia terapéutica o bien terapia profiláctica. Cuando en este documento se hace referencia a un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección utilizando un inhibidor particular o una combinación de inhibidores, se ha de entender que dicha referencia pretende incluir el uso de ese inhibidor o esa combinación de inhibidores para el fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de una afección mediada o asociada con IL-17, como la esclerosis múltiple.

10 La composición se suministrará generalmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método de administración a un paciente que se desee).

15 Los inhibidores de uso en la invención se administran preferiblemente a un sujeto por otras rutas diversas tales como oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratecal e intracerebroventricular. La ruta más adecuada para la administración dependerá en cualquier caso del inhibidor particular, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto.

Los inhibidores de uso en la invención pueden administrarse en combinación, por ejemplo, simultáneamente, secuencialmente o por separado, con uno o más de otros compuestos terapéuticamente activos, que pueden ser, por ejemplo, otras terapias anti-MS o terapias anticancerígenas.

20 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en formas de dosis unitaria que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por cada dosis. Dicha unidad puede contener, por ejemplo, pero sin que sea limitante, 750 mg/kg a 0,1 mg/kg, dependiendo de la condición que se esté tratando, la vía de administración y la edad, el peso y el estado del sujeto.

Los portadores farmacéuticamente aceptables para su uso en la invención pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración.

25 Las composiciones para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las preparaciones orales líquidas pueden estar en forma, por ejemplo, de suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Las preparaciones líquidas orales pueden contener agentes de suspensión como se conoce en la técnica.

30 En el caso de preparaciones sólidas orales tales como polvos, cápsulas y comprimidos, se pueden incluir vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma de unidad de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso generalmente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Además de las formas de dosificación comunes expuestas anteriormente, los agentes activos de la invención pueden también administrarse por medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración. Los comprimidos y cápsulas pueden comprender vehículos o excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina; lubricantes para confección de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; desintegrantes, por ejemplo almidón de patata; o agentes humectantes aceptables tales como lauril sulfato sódico. Los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas estándar acuosas o no acuosas de acuerdo con métodos bien conocidos en la práctica farmacéutica normal.

35 40 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del agente activo, como polvo o gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Dichas composiciones pueden prepararse por cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de asociar el agente activo con el vehículo, que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto en la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

45 50 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden prepararse como soluciones o suspensiones en agua de los agentes activos de la invención, mezcladas adecuadamente con un agente tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

55 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones de inyección estériles acuosas o no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir

agentes de suspensión y agentes espesantes. Se pueden preparar soluciones, dispersiones y suspensiones extemporáneas para inyección a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida se puede administrar una composición farmacéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin agujas, tal como los dispositivos descritos en los documentos n° 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: documento US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable, para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; documento n° 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; documento n° 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicamentos a una velocidad de infusión precisa; documento US n° 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; documento n° 4.439.196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos que tiene compartimentos de cámaras múltiples; y documento US n° 4.475.196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos. Muchos de estos otros implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

20 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, pulverizaciones, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos para espolvorear, y similares. Estas composiciones pueden prepararse mediante métodos convencionales que contienen el agente activo. Por lo tanto, también pueden comprender vehículos y aditivos convencionales compatibles, como conservantes, disolventes para facilitar la penetración de medicamentos, emolientes en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleílico para lociones. Dichos vehículos pueden estar presentes desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 98% de la composición. Más generalmente formarán hasta aproximadamente el 80% de la composición. Solo a título de ilustración, se prepara una crema o un ungüento mezclando cantidades suficientes de material hidrofílico y agua, que contiene de aproximadamente 5 a 10% en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o ungüento que tenga la consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado. Por ejemplo, el agente activo puede suministrarse desde el parche mediante iontoforesis.

30 Para aplicaciones en tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones se aplican preferiblemente como una pomada o crema tópica. Cuando se formula en una pomada, el agente activo puede emplearse con una base de pomada parafínica o miscible en agua. Alternativamente, el agente activo puede formularse en una crema con una base de crema aceite en agua o una base agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas, tabletas y colutorios.

35 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en el ojo incluyen colirios en los que el agente activo se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso. También incluyen cremas o pomadas tópicas como los anteriores.

40 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en las que el vehículo es un sólido se presentan lo más preferiblemente como supositorios de dosis unitaria. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao u otro glicérido o materiales comúnmente usados en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante la mezcla de la combinación con el vehículo o los vehículos ablandados o fundidos, seguidos de enfriamiento rápido y conformación en moldes. También se pueden administrar como enemas.

45 La dosis a administrar de un inhibidor de la actividad de la IL-17 variará de acuerdo con el inhibidor concreto, el tipo de enfermedad, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto, y la vía de administración seleccionada; la dosis apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia. Para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad en seres humanos y en animales, pueden administrarse a los pacientes (por ejemplo, sujetos humanos) composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos en dosis terapéutica o profilácticamente eficaces (por ejemplo, dosis cuyo resultado es la inhibición de la enfermedad y/o el alivio de los síntomas de la enfermedad) utilizando cualquier vía de administración adecuada, tal como la inyección y otras vías de administración conocidas en la técnica para productos clínicos, tales como productos clínicos basados en anticuerpos.

50 Las composiciones pueden contener de 0,1% en peso, preferiblemente de 10 a 60% en peso, o más, del inhibidor de la invención, dependiendo del método de administración.

55 Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad y el espaciado óptimos de las dosis individuales de un inhibidor de la invención vendrán determinadas por la naturaleza y el alcance de la afección que se trata, la forma, la ruta y el sitio de administración, y la edad y estado del sujeto que está siendo tratado en particular, y que un médico determinará en última instancia las dosis apropiadas a utilizar. Esta dosis puede repetirse con la frecuencia apropiada. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o la frecuencia de la dosis se pueden alterar o reducir, de acuerdo con la práctica clínica normal.

En otro ejemplo, cuando el inhibidor es un ácido nucleico, este puede administrarse mediante terapia génica (véase, por ejemplo, Hoshida, T. et al., 2002, *Pancreas*, 25: 111 - 121; Ikuno, Y. 2002, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002 43: 2406 - 2411; Bollard, C., 2002, *Blood* 99: 3179 - 3187; Lee E., 2001, *Mol. Med.* 7: 773 - 782). La terapia génica se refiere a la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En un ejemplo, este es el ácido nucleico de IL-17 o de IL-17R, o porciones del mismo. Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica se puede usar de acuerdo con la presente invención.

El suministro del ácido nucleico terapéutico a un paciente puede ser terapia génica directa *in vivo* (es decir, el paciente está expuesto directamente al ácido nucleico o al vector que contiene el ácido nucleico) o la terapia génica indirecta *ex vivo* (es decir, las células se transforman primero con el ácido nucleico *in vitro* y luego se trasplantan al paciente).

Por ejemplo, para la terapia génica *in vivo*, un vector de expresión que contiene el ácido nucleico IL-17 o IL-17R puede administrarse de tal manera que se convierta en intracelular, es decir, por infección utilizando un retroviral deficiente o atenuado, u otros vectores virales como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.980.286 o en Robbins et al., 1998, *Pharmacol. Ther.* 80: 35 - 47.

Los diversos vectores retrovirales que se conocen en la técnica son como los descritos en Miller et al. (1993, *Meth. Enzymol.* 217: 581 - 599) que han sido modificados para borrar las secuencias retrovirales que no son necesarias para el empaquetamiento del genoma viral y su posterior integración en el ADN de la célula hospedadora. También pueden usarse vectores adenovirales que son ventajosos debido a su capacidad para infectar células no en división y tales vectores adenovirales de alta capacidad se describen en Kochanek (1999, *Human Gene Therapy*, 10: 2451 - 2459). Los vectores víricos quiméricos que pueden usarse son los descritos por Reynolds et al. (1999, *Molecular Medicine Today*, 1: 25 - 31). También se pueden usar vectores híbridos, y están descritos por Jacoby et al. (1997, *Gene Therapy*, 4: 1282 - 1283).

La inyección directa de ADN desnudo o usando el bombardeo con micropartículas (p. ej. Gene Gun®; Biolistic, Dupont) o mediante recubrimiento con lípidos, se puede usar también en la terapia génica. Se pueden usar compuestos receptores transfectantes de la superficie celular o mediante encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas o administrando el ácido nucleico en unión con un péptido que se sabe que entra al núcleo o administrándolo en un enlace a un ligando predispuesto a la endocitosis mediada por receptor (véase Wu & Wu, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429 - 4432), para identificar tipos de células que expresan específicamente los receptores de interés.

En la terapia génica *ex vivo*, un gen es transferido a las células *in vitro* utilizando cultivo de tejidos y las células se suministran al paciente por diversos métodos, como la inyección subcutánea, la aplicación de las células a un injerto de piel y la inyección intravenosa de células sanguíneas recombinantes, como células madre o progenitoras hematopoyéticas.

Las células en las que se puede introducir un ácido nucleico IL-17 o IL-17R para los fines de la terapia génica incluyen, por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos y células sanguíneas. Las células sanguíneas que se pueden usar incluyen, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos, células hematopoyéticas o células progenitoras, y similares.

La invención se describirá ahora con referencia a los ejemplos que siguen, que son meramente ilustrativos y en ningún caso deben considerarse limitantes del alcance de la presente invención.

40 Figuras.

Figura 1: Datos del análisis de la expresión del gen LCN2 en cinco tejidos (cordón cervical, cordón lumbar, cordón torácico, bazo, ganglio linfático) de un modelo de ratón EAE, ambos controles (PBS) y después del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-17.

45 Figura 2: Efecto de Ab#13 mIgG1 en la enfermedad clínica cuando se administra durante la segunda fase de recaída. Promedio de puntuación clínica (+/- SEM) representado frente a días posteriores a la inmunización coadyuvante (Día de Post Sensibilización, PSD). El valor de tiempo de la muestra está indicado por la punta de flecha negra.

Figura 3: Niveles de proteína LCN2 en muestras de plasma de un modelo de ratón EAE (segunda recaída), tanto en el control (PBS) como después del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-17.

50 Ejemplos.

Ejemplo 1. Efecto del anticuerpo anti-IL-17 sobre la expresión del gen LCN2 en un modelo murino de MS (EAE).

El anticuerpo IL-17 anti-murino usado en estos experimentos fue Ab#13 IgG1 como se describe previamente en el documento WO05/051422.

El modelo MS, la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), se usó esencialmente como se describe en

Baker et al., 1990. Journal of Neuroimmunology, 28: 261 - 270. Se inmunizaron ratones ABH hembra de 8 a 10 semanas de edad (Harlan) con homogeneizado de médula espinal de ratón (SCH, 3,33 mg/ml) en adyuvante completo de Freund mediante inmunización subcutánea en cualquier flanco (150 µl/sitio) en PSD0 y PSD7.

i) Dosificación durante la fase aguda.

5 A dos grupos se les administró dosis de anticuerpos a 10 mg/kg, sc en PSD-1, PSD6, PSD13 y PSD20 (1 x semanalmente). A un grupo (n = 14) se le administró Ab#13 mlgG1 y al otro (n = 13) PBS.

ii) Dosificación durante la fase de recaída.

10 Un total de 30 ratones fueron seguidos durante la fase aguda de la enfermedad y en el análisis PSD27 de la fase aguda de la enfermedad se realizó para seleccionar dos grupos con perfiles de enfermedad similares en la fase aguda (día de aparición, pico de la puntuación de la enfermedad, puntuación clínica acumulativa y pérdida de peso). Se seleccionaron dos grupos de 12 ratones para la dosificación con anticuerpo a 10 mg/kg, sc en PSD28, PSD35, PSD42 y PSD49. A un grupo se le administró Ab#13 mlgG1 y al otro PBS.

Los pesos y las puntuaciones clínicas fueron registradas diariamente por un asesor ocultado al tratamiento, y se recolectó el EDTA-Plasma terminal.

15 Escala de puntuación clínica.

0 Normal

0,25 Arrastre de la cola

0,5 Parálisis parcial de la cola

1 Parálisis completa de la cola

20 2 Parálisis incompleta de las extremidades posteriores

3 Parálisis trasera completa/incontinencia

4 Parálisis de la extremidad delantera/pérdida del reflejo de direccionamiento

Estadística.

25 Las comparaciones por pares de las puntuaciones clínicas y el día de aparición se realizaron con el ensayo U de Mann-Whitney, el análisis de incidencia se realizó con el test exacto de Fishers, el análisis de la pérdida máxima de peso se realizó usando el ensayo T de Student.

Se tomaron muestras de tejido de cinco tejidos diferentes (cordón cervical, cordón lumbar, cordón torácico, bazo, ganglio linfático) en momentos diferentes PSD26 para el grupo *naive* no tratado previamente, PSD27, PSD33 y PSD62 para los grupos PBS y anti-IL-17.

30 La expresión del gen LCN2 en muestras de tejido del modelo de ratón EAE se determinó utilizando TaqMan® (Applied Biosystems. Probe Mm.00809552).

Síntesis de ADNc (transcripción inversa) y PCR en tiempo real.

35 Se utilizaron 75 ng de ARN total de cada una de las muestras de tejido en la reacción de transcripción inversa (RT). La reacción de RT se realizó siguiendo el protocolo utilizando los reactivos de TaqMan® RT (Applied Biosystems) que emplean el Gene Amp PCR System 9700 a 25 °C x 10 min, 37 °C x 60 min, 95 °C x 5 min, mantener 4 °C.

Se utilizó ADNc de cada reacción de RT en la PCR en tiempo real utilizando tarjetas de matriz de baja densidad (Low Density Array: LDA) de diseño personalizado que utilizan el sistema de PCR en tiempo real rápido Fast Real Time 7900 HT de Applied Biosystems.

Para cada mezcla de puertos LDA:

muestra de ADNc	20 µl
agua libre de RNasa/ADNasa	30 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	50 µl
Total	100 µl

40

La sonda para lipocalina 2 utilizada fue Applied Biosystems Probe Mm00809552_s1. Las condiciones de reacción fueron 50 °C x 2 min, 94,5 °C x 10 min, (97 °C x 30 seg y 59,7 °C x 1 min) x 40 ciclos.

Los datos de la PCR en tiempo real se analizaron utilizando los valores de CT obtenidos del software ABI SDS 2.1 utilizando el umbral automático y la línea de base. El gen 18S ARNr (sonda ABI Hs99999901_s1) se usó como gen endógeno/constitutivo o de mantenimiento para normalizar los valores de CT a la cantidad de ADNc presente en cada pocillo (valor Δ CT). Los cambios de plegado génico se calcularon después utilizando el Método de TC Comparativo de cuantificación relativa (de Kok et al., Real time quantification of human telomerase reverse transcriptase ANRm in tumors and healthy tissues, Clin. Chem. 2000. Mar; 46 (3): 313 - 8). El valor del calibrador utilizado en este experimento para calcular el valor $\Delta\Delta$ CT fue la media de los valores de Δ CT de las muestras *naive* para cada tipo de tejido. La cantidad relativa (o el cambio en veces) se calculó utilizando la fórmula: $2^{-\Delta\Delta CT}$.

El análisis de la expresión génica de 5 muestras de tejido (cordón cervical, cordón lumbar, cordón torácico, bazo, ganglio linfático) del modelo de ratón EAE descrito anteriormente resaltó una significativa regulación al alza del gen LCN2 a PSD33 en muestras de médula espinal. Esta expresión se redujo a los niveles de la línea de base mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-IL-17 (Figura 1).

	Ensayo t no pareado en el día 33 PBS frente anti-IL17		
	Cervical	Torácico	Lumbar
Valor de P	P < 0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001
Resumen de valores de P	***	***	***
¿Son las medias significativamente distintas? (P < 0,05)	Si	Si	Si

Ejemplo 2. Efecto del anticuerpo anti-IL-17 sobre los niveles de proteína LCN2 en plasma/suero de ratón en EAE.

El modelo de EAE y el anticuerpo anti-IL-17 fueron como se describe en el Ejemplo 1. El anticuerpo se usó a 10 mg/kg sc 1x semanalmente desde PSD48 como se describió anteriormente en el Ejemplo 1 (ii).

Las muestras de plasma se tomaron en la recaída-2 (en los controles), mientras que los animales tratados con anti-IL-17 fueron en gran parte asintomáticos. El momento exacto del muestreo fue cuando los controles alcanzaron la cronicidad, por lo que los rangos de PSD 72-82 (ocurriendo la mayoría entre PSD 80 - 82), como indica la flecha en la FIG. 2.

Las muestras de plasma tomadas en la recaída-2 se analizaron para detectar la presencia de la proteína LCN2 utilizando el protocolo que se describe a continuación.

Ensayo de MSD para la medida de Lcn2 de ratón.

Reactivos de R&D usados:

- anticuerpo monoclonal anti-mLcn2 desarrollado en ratas (nº de catálogo MAB 1857) utilizado para la captura (recubrimiento) (la solución madre es de 500 µg/ml en PBS)
- anticuerpo policlonal anti-mLcn2 desarrollado en cabras (nº de catálogo AF1857) utilizado como "primario" (la solución madre es de 200 µg/ml en PBS)
- Lcn2 de ratón recombinante, CF (nº de catálogo 1857-LC) utilizado como control.

Anticuerpo MSD utilizado:

- anticuerpo de detección IgG anti-cabra SULFOTAGGED desarrollado en asnos (nº de catálogo R32AG-5)

El ensayo de MSD se estableció de acuerdo con el siguiente protocolo:

Recubrimiento: Una placa de pocillos grande MSD High-Bind fue manchada con 5 µl por pocillo del anticuerpo de captura (monoclonal) a 100 µg/ml en PBS (FAC = 500 ng/pocillo). P. ej. 100 µl de solución madre en 400 µl de PBS para una placa y la placa se dejó secar durante 90 minutos en una campana de flujo laminar. La placa se lavó tres veces con 150 µl por pocillo de PBS + Tween 20 al 0,05%.

Bloqueo. Se preparó una solución de bloqueante A de MSD al 3% y bloqueante B de MSD al 1% en PBS + Tween 20 al 0,05% para usar como agente de bloqueo. Se agregaron 150 µl de tampón de bloqueo a todos los pocillos de la placa recubierta y la placa se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación vigorosa. La placa se

lavó después tres veces con PBS-Tween.

Unión:

Control: se preparó una curva estándar usando mLcn2 desde 40.000 pg hasta 9,76 pg/pocillo.

5 *Muestra:* se determinó la dilución óptima de muestras de plasma y orina (recomendado de 1/5 a 1/100) en PBS-tween y se cargaron 25 µl/pocillo. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación antes de ser lavada tres veces con PBS-Tween.

Primaria: El anticuerpo policlonal anti-mLcn2 desarrollado en cabras (nº de catálogo R&D AF1857) a 4 µg/ml en PBS-T se añadió a 25 µl/pocillo (= 100 ng/ml) antes de lavarse tres veces con PBS-Tween.

10 Secundaria: Se preparó MSD anti-cabra IgG SULFOTAGGED a 1 µg/ml en PBS + BSA al 1%. Se añadieron 25 µl de reactivo SULFOTAG a todos los pocillos y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después se lavó la placa tres veces con PBS-Tween.

Detección: Se añadieron 150 µl de MSD Read Buffer T a una concentración 1 x a todos los pocillos y la placa se leyó inmediatamente en el SectorImager 6000.

Resultados.

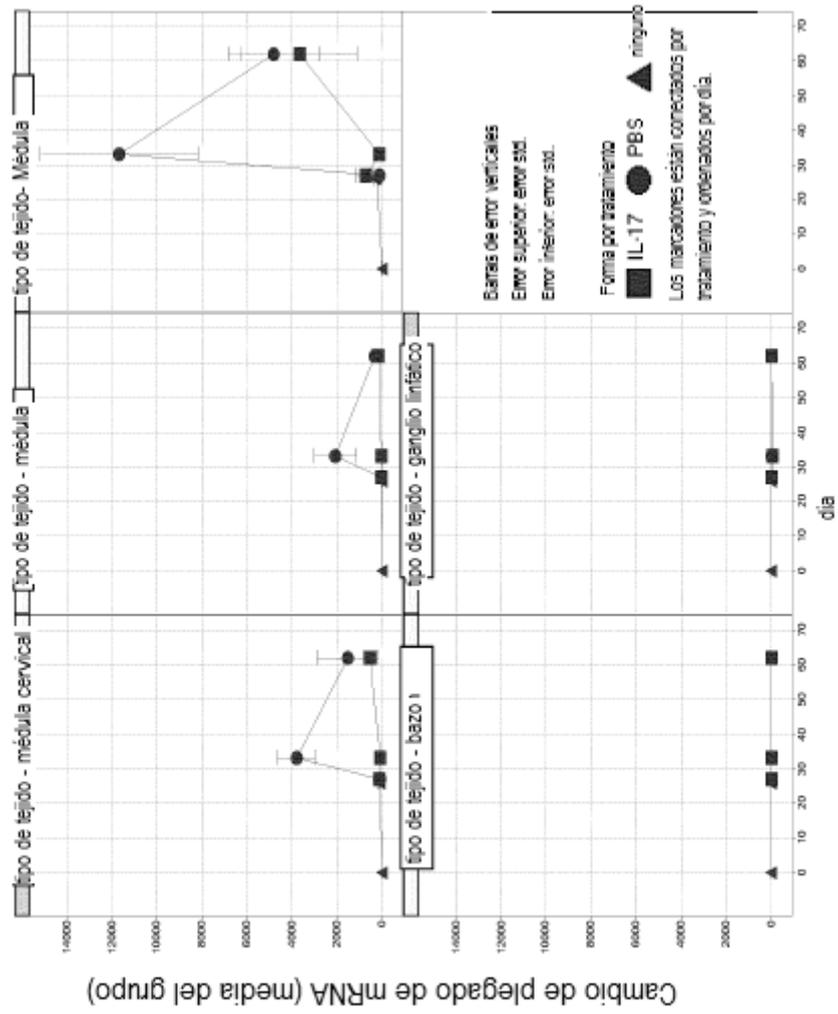
15 Los niveles de proteína LCN2 aumentaron en el grupo enfermo y se modularon con significación estadística por el anticuerpo anti-IL-17 (véase la Figura 3). * = $p < 0,05$ ANOVA con correcciones múltiples de Bonferroni. Los *naives* fueron emparejados por edad.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para controlar *in vitro* la respuesta de un sujeto que padece un trastorno mediado por IL-17 o asociado con un mayor nivel de IL-17 a un medicamento que comprende un inhibidor de IL-17, en donde el nivel de expresión de lipocalina 2 (LCN2) en una muestra de ensayo de un fluido o tejido corporal que ha sido obtenida del sujeto se establece antes y después de la administración de dicho medicamento y en donde el nivel de expresión de lipocalina 2 después de la administración de dicho medicamento se compara con el nivel de expresión de lipocalina 2 antes de la administración del medicamento con el fin de determinar la eficacia de la terapia con inhibidor de IL-17, en donde un descenso del nivel de expresión de lipocalina 2 es indicativo de una reducción del nivel de los efectos fisiológicos de IL-17 o relacionados con IL-17 y en donde el inhibidor de IL-17 es un anticuerpo anti-IL-17.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que el sujeto padece un trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil de aparición sistémica (JIA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, asma, enfermedad de las vías respiratorias obstructiva crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis atópica, esclerodermia, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y espondilitis anquilosante, y otras espondiloartropatías.
- 15 3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-IL17A o un anticuerpo anti-IL-17A/F.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de expresión de lipocalina 2 se determina midiendo el nivel de expresión de ARNm en la muestra de ensayo.
- 20 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de expresión de lipocalina 2 se determina midiendo el nivel de proteína lipocalina 2 en la muestra de ensayo.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra de ensayo se selecciona entre sangre, suero, plasma, orina, biopsia de tejido, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo y líquido de lavado broncoalveolar.
- 25 7. Un método *in vitro* para seleccionar un paciente que tiene un trastorno mediado por IL-17 o asociado con un aumento del nivel de IL-17 adecuado para el tratamiento con un medicamento que comprende un inhibidor de IL-17 comprendiendo el método:
 - (a) comparar un nivel medido de expresión de lipocalina 2 en una muestra de ensayo de un fluido corporal o tejido que ha sido obtenido de dicho paciente con un valor de referencia para la expresión de lipocalina 2; y
 - 30 (b) si es elevado en comparación con el valor de referencia, seleccionar dicho paciente para iniciar la terapia con un medicamento que comprende un inhibidor de IL-17 en donde el inhibidor de IL-17 es un anticuerpo anti-IL-17.
- 35 8. Un inhibidor de IL-17 para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por IL-17 en donde el inhibidor de IL-17 es un anticuerpo anti-IL-17, y el trastorno se selecciona entre el grupo consistente en artritis, artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil de aparición sistémica (JIA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, asma, enfermedad de las vías respiratorias obstructiva crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, dermatitis atópica, esclerodermia, esclerosis sistémica, fibrosis pulmonar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y espondilitis anquilosante, y otras espondiloartropatías, y el paciente se selecciona comparando el nivel de expresión de lipocalina 2 en una muestra de ensayo de un fluido corporal o tejido procedente de dicho paciente, con un valor de referencia.

40

Figura 1



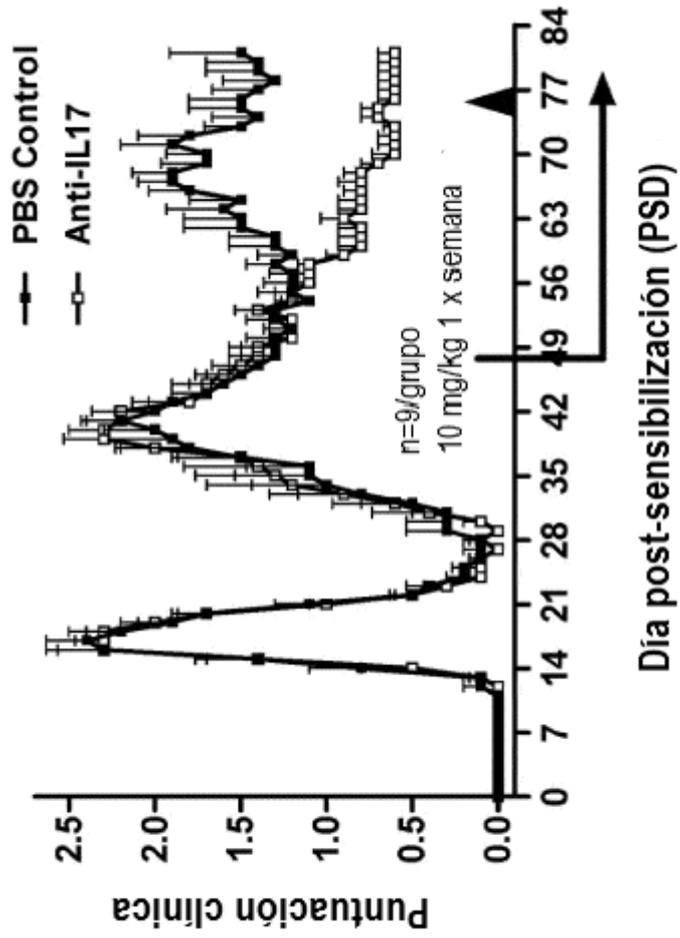


Figura 2

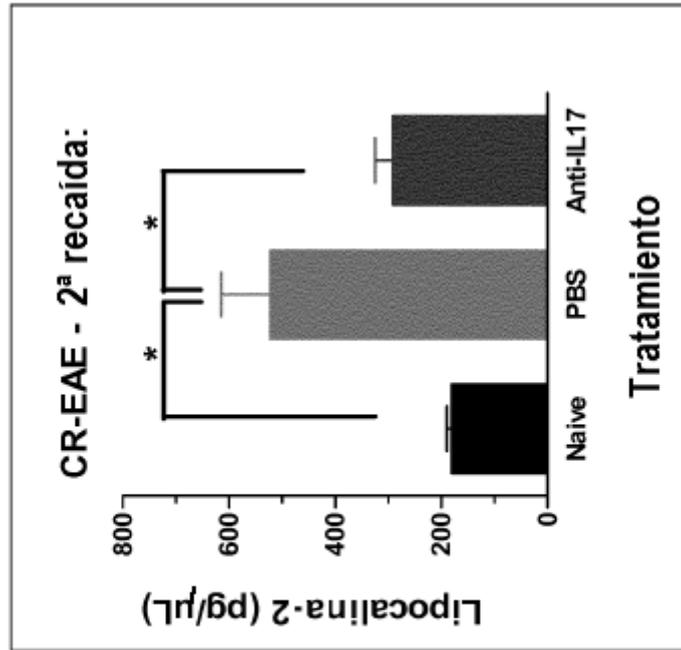


Figura 3