(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 729 064**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2007** **E 12175103 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** **EP 2514764**

(54) Título: **Moléculas de anticuerpo que se unen a IL-17A e IL-17F**

(30) Prioridad:

18.10.2006 GB 0620729

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.10.2019

(73) Titular/es:

UCB BIOPHARMA SPRL (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Brussels, BE

(72) Inventor/es:

ADAMS, RALPH;
POPPLEWELL, ANDREW GEORGE y
RAPECKI, STEPHEN EDWARD

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 729 064 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

Moléculas de anticuerpo que se unen a IL-17A e IL-17F

La presente invención se refiere a moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por determinantes antigénicos tanto de IL-17A como de IL-17F. La presente invención también se refiere a los usos terapéuticos de las moléculas de anticuerpo y a los métodos para producirlas.

La interleucina 17 (IL-17), también conocida como CTLA-8 ó IL-17A, es una citoquina pro-inflamatoria que estimula la secreción de un amplio abanico de otras citoquinas en diversas células no inmunes. La IL-17A es capaz de inducir la secreción de IL-6, IL-8, PGE2, MCP-1 y G-CSF mediante células adherentes como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales y endoteliales, y también es capaz de inducir la expresión superficial de ICAM-1, la proliferación de células T, y el 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-17A es producida 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). Las IL-17 que producen células T denominadas “células TH17” han sido implicadas en la patogénesis de determinados cánceres (Weaver et al., 2006, Immunity, 24, 677-688; Langowski et al., 2006, 442, 461-465; Iwakura e Ishigame, 2006, J. Clin. Invest. 116, 5, 1218-1222).

Se han identificado una serie de homólogos de IL-17 que presentan funciones tanto similares como distintas en la regulación de respuestas inflamatorias. Para una revisión de las familias de citoquinas/receptores IL-17 véase Dumont, 2003, Expert Opin. Ther. Patents, 13, 287-303. Uno de dichos homólogos es la IL-17F, también conocida como IL-24 y ML-1, que idéntica en aproximadamente un 55% a la IL-17A y se cree que comparte los mismos receptores que la IL-17A (Kolls y Linden 2004, Immunity, 21, 467-476; Hymowitz, et al., 2001, EMBO J. 20(19), 5332-5341; Kuestner et al., 2007, Journal of Immunology, 179, 5462-5473).

Tanto la IL-17A como la IL-17F pueden formar proteínas homodiméricas y heterodiméricas, todas las cuales son producidas por células T CD4+ humanas activadas (Wright et al., 2007, J Biol Chem. 282 (18), 13447-13455).

La IL-17 puede contribuir a una serie de enfermedades mediadas por respuestas inmunes anormales, tales como la artritis reumatoide y la inflamación de las vías respiratorias, así como el rechazo de trasplante de órgano y la inmunidad antitumoral. Los inhibidores de la actividad de IL-17 son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, una proteína de fusión IL-17R de ratón:Fc humana, una IL-17R soluble de ratón y un anticuerpo monoclonal anti-IL-17 han sido usados para demostrar el papel de la IL-17 en varios modelos de artritis reumatoide (Lubberts et al., J. Immunol. 2001, 167, 1004-1013; Chabaud et al., Arthritis Res. 2001, 3, 168-177). Adicionalmente, se ha usado la neutralización de anticuerpos policlonales para reducir la formación de adhesión peritoneal (Chung et al., 2002, J. Exp. Med., 195, 1471-1478). En el documento WO04/106377 se describieron anticuerpos de IL-17 anti-humanos derivados de rata. En el documento WO2006/054059 se describió un anticuerpo anti-IL-17 humanizado con una afinidad de aproximadamente 220 pM. En el documento WO2006/013107 se describió un anticuerpo anti-IL-17 completamente humano con una afinidad de aproximadamente 188 pM. En el documento WO2006/088833 se describieron anticuerpos que se unen a IL-17F y a heterodímeros IL-17A/IL-17F junto con un anticuerpo de ratón de reacción cruzada que reacciona de forma cruzada con IL-17F cuando esta proteína está presente en concentraciones elevadas en el ensayo de transferencia Western. En el documento WO2005/010044 se describieron anticuerpos que se unen específicamente al heterodímero IL-17A/IL-17F.

El antagonismo de IL-17F se ha asociado a la protección contra el asma (Kawaguchi et al., 2006, J. Allergy Clin. Immunol. 117(4); 795-801) y también se cree que la IL-17F desempeña una función en la patología de la artritis (Lubberts 2003, Current Opinion in Investigational Drugs, 4(5), 572-577).

Por consiguiente, los antagonistas duales de IL-17A e IL-17F pueden ser más efectivos que un único antagonista en el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-17. Los anticuerpos que se unen a IL-17A e IL-17F se describen en el documento WO2007/106769, publicado el 20/09/07.

Hemos sido capaces de demostrar que es posible aislar un anticuerpo que es capaz de unirse tanto a IL-17A como a IL-17F y que es capaz de neutralizar la actividad de ambas isoformas de la IL-17. Por tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana, que tiene una afinidad de unión a IL-17F mejor que 2 nM y una afinidad de unión a IL-17A mejor que 100 pM. En particular, el anticuerpo de la presente invención es capaz de unirse específicamente tanto a IL-17A como a IL-17F, es decir, el anticuerpo no se une a otras isoformas de la IL-17. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención también se une al heterodímero IL-17A/IL-17F. Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención neutraliza la actividad de IL-17A y de IL-17F. En una realización, el anticuerpo de la presente invención también neutraliza la actividad del heterodímero IL-17A/IL-17F. Los anticuerpos de la presente invención, por tanto, presentan la propiedad ventajosa de que pueden inhibir la actividad biológica de IL-17A y de IL-17F. En consecuencia, la presente invención también proporciona el uso de dichos anticuerpos en el tratamiento y/o la profilaxis de una enfermedad mediada por uno o por ambos de IL-17A e IL-17F, tal como una enfermedad autoinmune o inflamatoria o cáncer.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo neutralizante” describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la actividad de señalización biológica de la IL-17A y de la IL-17F, por ejemplo, bloqueando la unión de IL-17A y de IL-17F a uno o más de sus receptores, y bloqueando la unión del heterodímero IL-17A/IL-17F a uno o más de sus receptores. Cabe destacar que el término “neutralizante” tal como se usa en la presente memoria se refiere a una reducción de la actividad de señalización biológica que puede ser parcial o completa. Además, cabe destacar que el grado de neutralización de la actividad de IL-17A y de IL-17F mediante el anticuerpo puede ser igual o diferente. En una realización el grado de neutralización de la actividad del heterodímero IL-17A/IL-17F puede ser igual o diferente al grado de neutralización de la actividad de IL-17A o de IL-17F.

En una realización los anticuerpos de la presente invención se unen específicamente a IL-17A e IL-17F. Específicamente significa que los anticuerpos tienen una afinidad mayor por polipéptidos de IL-17A y de IL-17F (que incluyen el heterodímero IL-17A/IL-17F) que por otros polipéptidos. Preferiblemente, los polipéptidos IL-17A e IL-17F son humanos. En una realización, el anticuerpo también se une a IL-17F de mono Cynomolgus.

Los polipéptidos de IL-17A o de IL-17F o una mezcla de los dos, o las células que expresan uno o ambos de dichos polipéptidos, pueden usarse para producir anticuerpos que reconocen específicamente ambos polipéptidos. Los polipéptidos de IL-17 (IL-17A e IL-17F) pueden ser polipéptidos “maduros” o fragmentos o derivados de los mismos biológicamente activos que incluyen preferiblemente el sitio de unión a receptor. Preferiblemente los polipéptidos de IL-17 son polipéptidos maduros. Los polipéptidos de IL-17 pueden prepararse mediante procesos bien conocidos en la técnica a partir de células hospedantes 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 pueden usarse de forma intercambiable a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido de IL-17 puede ser parte en algunos casos de una proteína de mayor tamaño, tal como una proteína de fusión, por ejemplo fusionada a una etiqueta de afinidad. Los anticuerpos generados contra dichos polipéptidos pueden obtenerse, cuando sea necesaria la inmunización de un animal, mediante la administración de los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase por ejemplo “Handbook of Experimental Immunology”, D. M. Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986). Muchos animales de sangre caliente, tal como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas o cerdos, pueden inmunizarse. Sin embargo, generalmente se prefieren los ratones, conejos, cerdos y ratas.

Los anticuerpos para uso en la presente invención incluyen anticuerpos completos y fragmentos o derivados de los mismos funcionalmente activos, y pueden ser, aunque sin limitación, anticuerpos monoclonales, multi-valentes, multi-específicos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de dominio, p.ej., anticuerpos de VH, VL, VHH, de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos Fab’ y $F(ab')_2$ y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores. Otros fragmentos de anticuerpos incluyen los descritos en las solicitudes internacionales de patente WO2005003169, WO2005003170 y WO2005003171. Los fragmentos de anticuerpo 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; Adair y Lawson, 2005. Therapeutic antibodies. Drug Design Reviews – Online 2(3): 209-217.

Los anticuerpos para uso en la presente invención incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (p.ej., IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o una subclase de molécula de inmunoglobulina.

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

Los anticuerpos para uso en la invención también pueden generarse usando métodos de anticuerpos de linfocito individual clonando y expresando ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocito individual seleccionado para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(15): 7843-78481; WO92/02551; WO2004/051268 y la Solicitud de Patente Internacional número WO2004/106377.

Los anticuerpos humanizados son moéculas de anticuerpos de especies no humans que tienen una o más regiones que determinan la complementariedad (CDRs) de la especie no humana y una región marco de una molévula de inmunoglobulina humana (véase p. ej., los documentos US 5.585.089**;** WO91/09967).

Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que han sido modificados genéticamente de tal modo que los genes de cadena ligera y pesada estén compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a especies diferentes. Estos anticuerpos quiméricos probablemente son menos antigénicos. Los anticuerpos bivalentes pueden prepararse mediante 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 multi-valentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véase por ejemplo los documentos WO 92/22853 y WO 05/113605).

Los anticuerpos para uso en la presente invención también pueden generarse usando varios métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica, e incluyen los descritos en 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 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. nº 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 sencilla, tales como los descritos en la Patente de EE.UU. nº 4.946.778 también pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla que se unen a IL-17A y a IL-17F. Asimismo, para expresar anticuerpos humanizados se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos.

Los residuos de los dominios variables de anticuerpo se numeran convencionalmente según un sistema ideado por Kabat *et al.* Este sistema se establece en Kabat *et al.*, 1987, en “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, US Department of Health and Human Services, NIH, EE.UU. (citado a partir de este momento como “Kabat *et al.* (ver anterior)”). Este sistema de numeración se usa en la presente específicamente, a menos que se indique lo contrario.

Las designaciones de residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácido. La secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales respecto a la numeración Kabat estricta correspondiente a un acortamiento, o una inserción, de un componente estructural, tanto en la estructura como en la región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura de dominio variable básica. La numeración Kabat correcta de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado mediante el alineamiento de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada Kabat “estándar”.

Las CDRs del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35 (CDR-H1), los residuos 50-65 (CDR-H2) y los residuos 95-102 (CDR-H3) según el sistema de numeración Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 196 901-917 (1987)), el equivalente de lazo a CDR-H1 se extiende desde el residuo 26 hasta el residuo 32. Por tanto, “CDR-H1”, tal como se usa en la presente memoria, comprende los residuos 26 a 35, tal como se describe mediante una combinación del sistema de numeración Kabat y la definición de lazo topológico Chothia.

Las CDRs del dominio variable de cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (CDR-L1), los residuos 50-56 (CDR-L2) y los residuos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración Kabat.

En una realización, la presente invención presenta un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por IL-17A humana e IL-17F humana, que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una CDR que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, una CDR que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y una CDR que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por IL-17A humana e IL-17F humana, que comprende una cadena pesada, en donde al menos dos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del dominio variable de la cadena pesada se seleccionan entre las siguientes: la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 1 y CDR-H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 2. Alternativamente, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en la que CDR-H1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 1 y CDR-H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 3, o el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en donde CDR-H2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 2 y CDR-H3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 3. Para evitar dudas, se entiende que se incluyen todas las permutaciones.

En otra realización la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por IL-17A e IL-17F humanas, que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3.

En una realización la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por IL-17A humana e IL-17F humana, que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y una CDR que tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

En otra realización la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por IL-17A humana e IL-17F humana, que comprende una cadena ligera, en donde al menos dos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del dominio variable de la cadena ligera se seleccionan entre las siguientes: la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia

proporcionada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en donde CDR-L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4 y CDR-L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5. Alternativamente, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en donde CDR-L1 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4 y CDR-L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6, o el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en donde CDR-L2 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5 y CDR-L3 tiene la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6. Para evitar dudas, se entiende que se incluyen todas las permutaciones.

En otra realización la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por IL-17A y de IL-17F humanas, que comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención comprenden preferiblemente una cadena ligera complementaria o una cadena pesada complementaria, respectivamente.

Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo según la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 1 para la CDR-H1, la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 2 para la CDR-H2 y la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 3 para la CDR-H3, y una cadena ligera en la que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4 para la CDR-L1, la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5 para la CDR-L2 y la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6 para la CDR-L3.

Cabe destacar que se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácido a las CDRs proporcionadas por la presente invención sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a IL-17A y a IL-17F y para neutralizar la actividad de IL-17A y de IL-17F. El efecto de cualquier sustitución de aminoácido sobre la unión y la neutralización puede evaluarse fácilmente por parte del especialista en la técnica, por ejemplo usando métodos descritos en la presente memoria. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que comprende una o más CDRs seleccionadas entre la CDRH-1 (SEQ ID NO: 1), la CDRH-2 (SEQ ID NO: 2), la CDRH-3 (SEQ ID NO: 3), la CDRL-1 (SEQ ID NO: 4), la CDRL-2 (SEQ ID NO: 5) y la CDRL-3 (SEQ ID NO: 6), en las que uno o más aminoácidos de una o más de las CDRs puede ser alterado sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a IL-17A y a IL-17F y para neutralizar la actividad de IL-17A y de IL-17F.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDRs, en donde la secuencia de la CDRH-1 tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, la CDRH-2 tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y/o la CDRH-3 tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3. En otra realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDRs, en donde la secuencia de CDRH-1 tiene una identidad o una similitud del 70%, 80%, 90%, 95% ó 98% respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 1, la CDRH-2 tiene una identidad o una similitud del 70%, 80%, 90%, 95% ó 98% respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y/o CDRH-3 tiene una identidad o una similitud del 70%, 80%, 90%, 95% ó 98% respecto a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 3.

“Identidad”, tal como se usa en la presente memoria, indica que en cualquier posición particular de las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es idéntico entre las secuencias. “Similitud”, tal como se usa en la presente memoria, indica que, en cualquier posición particular de las secuencias alineadas, el residuo de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina puede ser sustituida por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que pueden ser sustituidos a menudo por otro residuo incluyen, aunque sin limitación:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre).

Los grados de identidad y similitud pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M. y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991).

En otra realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende tres CDRs en donde la secuencia de CDRL-1 tiene al menos un 60% de

identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4, CDRL-2 tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5 y/o CDRL-3 tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6. En otra realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende tres CDRs en donde la secuencia de CDRL-1 tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4, CDRL-2 tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5 y/o CDRL-3 tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6.

En una realización, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es un anticuerpo monoclonal.

En una realización, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es un anticuerpo quimérico.

En una realización, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es una molécula de anticuerpo anclada a CDR que comprende una o más de las CDRs proporcionadas por las SEQ ID NOs: 1 a 6. Tal como se usa en la presente memoria, el término “molécula de anticuerpo anclada a CDR” se refiere a una molécula de anticuerpo en la que la cadena pesada y/o ligera contiene una o más CDRs (que incluyen, si se desea, una o más CDRs modificadas) procedentes de un anticuerpo donante (p.ej., un anticuerpo monoclonal de ratón) anclado en la estructura de región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo aceptor (p.ej., un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology, 16, 535-539, 1998. En una realización, en lugar de transferir la CDR entera, solo se transfiere a la estructura del anticuerpo humano uno o más de los residuos determinantes de especificidad de una de las CDRs descritas en la presente memoria (véase, por ejemplo, Kashmiri *et al.*, 2005, Methods, 36, 25-34). En una realización solo se transfieren a la estructura del anticuerpo humano los residuos determinantes de especificidad de una o más de las CDRs descritas en la presente memoria anteriormente. En otra realización, solo se transfieren a la estructura del anticuerpo humano los residuos determinantes de especificidad de todas las CDRs descritas en la presente memoria anteriormente.

Cuando se anclan CDRs o residuos determinantes de especificidad, se puede usar cualquier estructura de región variable aceptora apropiada teniendo en cuenta la clase/tipo de anticuerpo donante a partir del cual se derivan las CDRs, que incluyen regiones estructurales de ratón, primate y humano. Preferiblemente, el anticuerpo anclado a CDR según la presente invención tiene un dominio variable que comprende regiones estructurales aceptoras humanas así como una o más de las CDRs o de los residuos determinantes de especificidad descritos anteriormente. Por tanto, en una realización se proporciona un anticuerpo anclado a CDR neutralizante en el que el dominio variable comprende regiones estructurales aceptoras humanas y CDRs donantes no humanas.

Los ejemplos de estructuras humanas que pueden usarse en la presente invención son KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al., ver anterior). Por ejemplo, se pueden usar KOL y NEWM para la cadena pesada, se puede usar REI para la cadena ligera y se pueden usar EU, LAY y POM tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, se pueden usar secuencias de línea germinal humana; éstas están disponibles en: http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/

En un anticuerpo anclado a CDR de la presente invención, las cadenas aceptoras pesada y ligera no necesitan forzosamente derivar del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas con regiones estructurales de cadenas diferentes.

La región estructural preferida para la cadena pesada del anticuerpo anclado a CDR de la presente invención se deriva de la secuencia de subgrupo VH3 humano 1-3 3-07 junto con JH4. Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo anclado a CDR neutralizante que comprende al menos una CDR de donante no humana, en donde la región estructural de cadena pesada se deriva de la secuencia de subgrupo 1-3 3-07 junto con JH4. La secuencia de JH4 humana es como se indica a continuación: (YFDY)WGQGTLVTVSS. La estructura YFDY es parte de la CDR-H3 y no es parte de la estructura 4 (Ravetch, JV. *et al.*, 1981, Cell, 27, 583-591).

La región estructural preferida para la cadena ligera del anticuerpo anclado a CDR de la presente invención se deriva de la secuencia VK1 de subgrupo de línea germinal humano 2-1-(1) L4 junto con JK1. Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo anclado a CDR neutralizante que comprende al menos una CDR donante no humana en donde la región estructural de cadena ligera se deriva de la secuencia VK1 de subgrupo humano 2-1-(1) L4 junto con JK1. La secuencia JK1 es como se indica a continuación: (WT)FGQGTKVEIK. La estructura WT es parte de la CDR-L3 y no es parte de la estructura 4 (Hieter, PA., *et al.*, 1982, J. Biol. Chem., 257, 1516-1522).

Asimismo, en un anticuerpo anclado a CDR de la presente invención, las regiones estructurales no necesitan tener exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo aceptor. Por ejemplo, se pueden cambiar los residuos inusuales por residuos más frecuentes para dicha clase o tipo de cadena aceptora. Alternativamente, se pueden cambiar residuos seleccionados de las regiones estructurales aceptoras de tal modo que se correspondan con el residuo observado en la misma posición del anticuerpo donante (véase Reichmann *et al.,* 1998, Nature, 332, 323-324). Dichos cambios deberían mantenerse al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo donante. Un protocolo para seleccionar residuos en las regiones estructurales aceptoras que puede ser necesario cambiar es

el establecido en el documento WO 91/09967.

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo anclada a CDR de la presente invención si la cadena pesada aceptora tiene la secuencia VH3 humana 1-3 3-07 junto con JH4, entonces las regiones estructurales aceptoras de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDRs donantes, un residuo donante en al menos la posición 94 (según Kabat *et al.*, (ver anterior)). Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo anclado a CDR, en donde al menos el residuo de la posición 94 del dominio variable de la cadena pesada es un residuo donante.

Preferiblemente, en una molécula de anticuerpo anclada a CDR según la presente invención si la cadena ligera aceptora tiene la secuencia VK1 de sub-grupo humano 2-1-(1) L4 junto con JK1, entonces no se transfieren residuos de donante, es decir, solo se transfieren las CDRs. Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo anclado a CDR en donde solo se transfieren las CDRs a la estructura donante.

Los residuos de donante son residuos del anticuerpo donante, es decir, el anticuerpo del cual derivaron originalmente las CDRs.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 9 (gH9).

En otra realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud con la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 9. En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 9.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 7 (gL7).

En otra realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene una identidad o una similitud de al menos un 60% con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 7. En una realización el anticuerpo de la presente invención comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 7.

En una realización, un anticuerpo de la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia administrada en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 7.

En otra realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 9 y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 7. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 7.

Tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, la molécula de anticuerpo de la presente invención puede comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, o un fragmento de las mismas, tal como un anticuerpo de dominio, p.ej., VH, VL, VHH, Fab, Fab modificado, Fab', $F(ab')_2$, Fv o fragmento scFv.

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que puedan requerirse. Por ejemplo, los dominios de región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG ó IgM humanos. En particular, se pueden usar los dominios de región constante IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren las funciones efectoras de anticuerpo. Alternativamente, se pueden usar los isotipos IgG2 e IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está destinada para propósitos terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpo, p.ej. simplemente para bloquear la actividad de IL-17. Por ejemplo, se pueden usar las moléculas de IgG4 en las que la serina de la posición 241 ha sido cambiada a prolina según se describe en Angal *et al.*, Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108. Particularmente preferido es el dominio constante de IgG4 que comprende dicho cambio.

En una realización la cadena pesada de anticuerpo comprende un dominio CH1 y la cadena ligera de anticuerpo

comprende un dominio CL, kappa o lambda.

En una realización preferida el anticuerpo proporcionado por la presente invención es un anticuerpo neutralizante que presenta especificidad por IL-17A humana y por IL-17F humana, en donde la región constante de cadena pesada comprende la región constante de IgG4 humana, en la que la serina de la posición 241 ha sido sustituida por prolina como se describe en Angal *et al.*, ver anterior. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo en el que la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 15.

En una realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 15. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos un 70%, 80%, 90%, 95% ó 98% respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 15.

En una realización una molécula de anticuerpo según la presente invención comprende una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 11.

En una realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 11. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos un 70%, 80%, 90%, 95% ó 98%, respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 11.

En una realización la presente invención proporciona un anticuerpo en el que la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 15 y la cadena ligera comprende o consiste de la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 11.

En una realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 15 y la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 60% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 11. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 15 y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos un 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con respecto a la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 11.

La presente invención también proporciona una región o epítopo específico de IL-17A humana y/o una región o epítopo específico de IL-17F humana y/o una región o epítopo específico de heterodímero IL-17A/F humano que es ligado por un anticuerpo proporcionado por la presente invención, en particular un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y/o la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7).

La región o epítopo específico del polipéptido de IL-17A humana y la región o epítopo específico del polipéptido de IL-17F humana y la región o epítopo específico del heterodímero IL-17A/F humano puede identificarse mediante cualquier método de mapeado de epítopos adecuado conocido en la técnica, en combinación con uno cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de dichos métodos incluyen el escrutinio de péptido de longitudes variables derivados de IL-17A y de IL-17F en términos de unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que pueda unirse específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítopo reconocido por el anticuerpo. Los péptidos de IL-17 pueden ser producidos sintéticamente o mediante digestión proteolítica del polipéptido de IL-17 apropiado. Los péptidos que se unen al anticuerpo pueden identificarse, por ejemplo, mediante un análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, se puede usar espectroscopía de RMN para identificar el epítopo unido mediante un anticuerpo de la presente invención. Una vez identificado, el fragmento epitópico que se une a un anticuerpo de la presente invención puede usarse, si se requiere, como inmunógeno para obtener anticuerpos neutralizantes adicionales que se unen al mismo epítopo.

Los anticuerpos que bloquean de forma cruzada la unión de un anticuerpo según la presente invención, en particular, un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7), pueden ser útiles de forma similar para neutralizar la actividad de IL-17A y de IL-17F. Por consiguiente, la presente invención también proporciona un anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana, que tiene una afinidad de unión a IL-17F mejor que 2 nM y una afinidad de unión a IL-17A mejor que 100 pM, que bloquea de forma cruzada la unión de uno cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente a IL-17A humana y/o IL-17F humana y/o heterodímero IL-17A/F humano, y/o es bloqueado de forma cruzada frente a la unión de IL-17A y/o de IL-17F y/o de heterodímero IL-17A/F por uno cualquiera de dichos anticuerpos. En una realización, dicho anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo descrito anteriormente en la presente memoria. En otra realización, el anticuerpo neutralizante que bloquea de forma cruzada se une a un epítopo que bordea y/o solapa con el epítopo unido a un anticuerpo descrito anteriormente en la presente memoria. En otra realización, el anticuerpo neutralizante que bloquea de forma cruzada de este aspecto de la invención no se une al mismo epítopo que el anticuerpo de la presente invención o a un epítopo que bordea y/o solapa con dicho

epítopo.

Los anticuerpos de bloqueo cruzado pueden identificarse usando cualquier método adecuado de la técnica, por ejemplo usando ELISA competitivo o BIAcore, en donde la unión del anticuerpo de bloqueo cruzado a IL-17A humana y/o a IL-17F humana previene la unión de un anticuerpo de la presente invención o viceversa.

En una realización se proporciona un anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana que tiene una afinidad por IL-17F mejor que 2 nM y una afinidad por IL-17A mejor que 100 pM, que bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH9 (SEQ ID NO: 9) y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL7 (SEQ ID NO: 7) a IL-17A humana y a IL-17F humana. En una realización, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención inhiben la unión de un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7) a IL-17A en más de un 80%, preferiblemente en más de un 85%, más preferiblemente en más de un 90%, incluso más preferiblemente en más de un 95%, y a IL-17F en más de un 80%, preferiblemente en más de un 85%, más preferiblemente en más de un 90%, incluso más preferiblemente en más de un 95%.

En una realización se proporciona un anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana que tiene una afinidad por IL-17F mejor que 2 nM y una afinidad por IL-17A mejor que 100 pM, que bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH9 (SEQ ID NO: 9) y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL7 (SEQ ID NO: 7) a IL-17A humana y a IL-17F humana y a heterodímero IL-17A/F humano. En una realización, los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados en la presente invención inhiben la unión de un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7) a IL-17A en más de un 80%, preferiblemente en más de un 85%, más preferiblemente en más de un 90%, incluso más preferiblemente en más de un 95%, y a IL-17F en más de un 80%, preferiblemente en más de un 85%, más preferiblemente en más de un 90%, incluso más preferiblemente en más de un 95%, y al heterodímero IL-17A/F a IL-17F en más de un 80%, preferiblemente en más de un 85%, más preferiblemente en más de un 90%, incluso más preferiblemente en más de un 95%.

En una realización se proporciona un anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana que tiene una afinidad por IL-17F mejor que 2 nM y una afinidad por IL-17A mejor que 100 pM, que bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo cuya cadena pesada comprende la secuencia gH9 (SEQ ID NO: 9) y cuya cadena ligera comprende la secuencia gL7 (SEQ ID NO: 7) a IL-17A humana o a IL-17F humana o a heterodímero IL-17A/F humano. En una realización los anticuerpos de bloqueo cruzado proporcionados por la presente invención inhiben la unión de un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7) a IL-17A o IL-17F o IL-17A/F humanos en de un 80%, preferiblemente en más de un 85%, más preferiblemente en más de un 90%, incluso más preferiblemente en más de un 95%.

Alternativa o adicionalmente, los anticuerpos neutralizantes según este aspecto de la invención pueden ser bloqueados de forma cruzada en la unión a IL-17A humana y a IL-17F humana por un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7). Por tanto, también se proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana que tiene una afinidad por IL-17F mejor que 2 nM y una afinidad por IL-17A mejor que 100 pM, que es bloqueado de forma cruzada en a la unión a IL-17A humana y a IL-17F humana por un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7). En una realización los anticuerpos neutralizantes proporcionados por este aspecto de la invención son inhibidos en la unión a IL-17A humana y a IL-17F humana por un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7) en más de un 80%, preferiblemente en más de un 85%, más preferiblemente en más de un 90%, incluso más preferiblemente en más de un 95%.

En otra realización se proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana que tiene una afinidad por IL-17F mejor que 2 nM y una afinidad por IL-17A mejor que 100 pM, que es bloqueado de forma cruzada en la unión a IL-17A humana y a IL-17F humana y a heterodímero IL-17A/F por un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7). En una realización los anticuerpos neutralizantes proporcionados por este aspecto de la invención son inhibidos en la unión a IL-17A humana y a IL-17F humana y a heterodímero IL-17A/F por un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7) en más de un 80%, preferiblemente en más de un 85%, más preferiblemente en más de un 90%, incluso más preferiblemente en más de un 95%.

Por lo tanto, también se proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana que tiene una afinidad por IL-17F mejor que 2 nM y una afinidad por IL-17A mejor que 100 pM, que es bloqueada de forma cruzada en la unión a IL-17A humana o IL-17F humana o IL-17A/F humano por un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7). En una realización los anticuerpos neutralizantes proporcionados por este aspecto de la invención son inhibidos en la unión a IL-17A humana o a IL-17F humana o a heterodímero IL-17A/F por un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada gH9 (SEQ ID NO: 9) y la secuencia de cadena ligera gL7 (SEQ ID NO: 7) en más de un 80%, preferiblemente en más de un 85%, más preferiblemente en más de un 90%, incluso más

preferiblemente en más de un 95%.

La molécula de anticuerpo de cualquier aspecto de la presente invención preferiblemente tiene una elevada afinidad de unión, preferiblemente nanomolar, incluso más preferiblemente picomolar. Cabe destacar que la afinidad de unión de un anticuerpo según la presente invención por IL-17A humana puede ser diferente de la afinidad de unión del mismo anticuerpo por IL-17F human y/o el heterodímero IL-17A/F. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad por IL-17A que es superior a su afinidad por IL-17F. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad por IL-17A que es al menos 10 veces mayor que su afinidad de unión por IL-17F. En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención presenta una afinidad por la IL-17A que es al menos 50 veces mayor que su afinidad de unión por IL-17F. En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad por IL-17A que es al menos 100 veces superior que su afinidad por IL-17F. En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad por IL-17F que es superior a su afinidad por IL-17A. En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad por IL-17A que es igual a su afinidad por IL-17F. En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad picomolar por IL-17A y una afinidad nanomolar por IL-17F. En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad nanomolar por IL-17F y una afinidad picomolar por IL-17A. En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad picomolar por ambas, IL-17A e IL-17F.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión a IL-17A mejor que 100 pM. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión por IL-17A mejor que 20 pM. En una realización, el anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad por IL-17A de 16 pM.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión por IL-17F mejor que 2 nM. En una realización, el anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad por IL-17F de 1,75 nM.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión por heterodímero IL-17A/F mejor que 10 nM. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad por heterodímero IL-17A/F mejor que 500 pM. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión por heterodímero IL-17A/F mejor que 150 pM. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión por heterodímero IL-17A/F de 116 pM.

En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión por IL-17F de mono cynomolgus mejor que 2 nM. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión por IL-17F de mono cynomolgus de 1,03 nM.

Cabe destacar que la afinidad de los anticuerpos proporcionada por la presente invención puede ser alterada usando cualquier método conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por IL-17A y/o IL-17F. Dichas variantes pueden obtenerse mediante una serie de protocolos de maduración de afinidad que incluyen mutar las CDRs (Yang *et al.*, J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), el barajado de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low *et al.*, J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), el barajado de ADN (Patten *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), la presentación de fagos (Thompson *et al.*, J. Mol. Biol., 256, 77-88, 1996) y la PCR sexual (Crameri *et al.*, Nature, 391, 288-291, 1998). Vaughan *et al.* (ver anterior) discute estos métodos de maduración de afinidad.

En una realización las moléculas de anticuerpo de la presente invención neutralizan la actividad de IL-17A y de IL-17F, por ejemplo en los ensayos *in vitro* descritos en los Ejemplos. En una realización la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por IL-17A e IL-17F humanas, que es capaz de inhibir la actividad de IL-17A humana 0,8 nM en un 50% a una concentración inferior a 5 nM y la actividad de IL-17F 4,2 nM en un 50% a una concentración inferior a 12 nM, midiéndose dicha actividad inhibidora en la liberación de IL-6 inducida por IL-17A e IL-17F en células Hela. En una realización la concentración de anticuerpo que inhibe la IL-17A en un 50% es inferior a 3 nM. En una realización la concentración de anticuerpo que inhibe la IL-17F en un 50% es inferior a 11 nM. En una realización la IL-17A humana y la IL-17F humana usadas en el ensayo son IL-17A e IL-17F humanas recombinantes. En una realización el anticuerpo neutralizante es un anticuerpo humanizado o completamente humano.

Si se desea, un anticuerpo para uso en la presente invención puede conjugarse a una o más molécula(s) efector(as). Cabe destacar que la molécula efectora puede comprender una única molécula efectora o dos o más de dichas moléculas ligadas de tal modo que formen un único resto que pueda unirse a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desee obtener un fragmento de anticuerpo ligado a una molécula efectora, éste se puede preparar mediante procedimientos estándar químicos o de ADN recombinante en los que el fragmento de anticuerpo es ligado directamente o a través de un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar dichas moléculas efectoras a los anticuerpos son bien conocidas en la técnica (véase, Hellstrom *et al.*, Controlled Drug Delivery, 2ª edición, Robinson *et al.*, eds., 1987, pág. 623-53; Thorpe *et al.*, 1982, Immunol. Rev., 62: 119-58 y Dubowchik *et al.*, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y

WO03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, la unión puede lograrse usando procedimientos de ADN recombinante, por ejemplo como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

El término molécula efectora tal como se usa en la presente memoria incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo, polímeros sintéticos o naturales, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, p.ej., ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que puedan ser detectados mediante espectroscopía de RMN o ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos que incluyen cualquier agente que sea perjudicial para células (p.ej., que las mate). Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maytansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidium, emetina, mitomicina, etoposide, tenoposide, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracin diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-des-hidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos y homólogos de los mismos.

Las moléculas efectoras también incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (p.ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (p.ej., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamia, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino II (DDP) cisplatino), antraciclinas (p.ej., daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubinica), antibióticos (p.ej., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (p.ej., vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y, Lu^{177}, Bismuto^{213}, Californio^{252}, Iridio^{192} y Wolframio^{188}/Renio^{188}; o fármacos tales como, aunque sin limitación, alquilfosfocolinas, inhibidores de topoisomerasa I, taxoides y suramina.

Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, aunque sin limitación, enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, polipéptidos y péptidos de interés incluyen, aunque sin limitación, inmunoglobulinas, toxinas tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de difteria, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α, interferón β, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaqueta o activador de plasminógeno de tejido, un agente trombótico o una agente anti-angiogénico, p.ej., angioestatina o endoestatina, o un modificador de respuesta biológica tal como una linfoquina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento conocido e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles por ejemplo en diagnosis. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleídos radioactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía de emisión positrónica), e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase de forma general la Patente de EE.UU. nº 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso en diagnosis. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los nucleídos radioactivos adecuados incluyen ^{125}I, ^{131}I, ^{111}In y ^{99}Tc.

En otro ejemplo la molécula efectora puede incrementar la vida media del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmune. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en el documento WO 05/117984.

Cuando la molécula efectora es un polímero puede, de forma general, ser un polímero sintético o natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquenileno o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido, o un polisacárido ramificado o sin ramificar, p.ej., un homo- o hetero-polisacárido.

Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxi, metilo o metoxi.

Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(vinilalcohol) de cadena lineal o ramificada, opcionalmente sustituidos, o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) sustituido opcionalmente tal como metoxipoli(etilenglicol) o sus derivados.

Los polímeros naturales particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

“Derivados”, tal como se usa en la presente memoria, pretende incluir derivados de reacción, por ejemplo grupos reactivos selectivos a tiol tales como maleimidas y similares. El grupo reactivo puede estar ligado al polímero directamente o a través de un segmento ligando. Cabe destacar que el residuo de dicho grupo en algunos casos formará parte del producto como grupo ligando entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero generalmente estará en un rango de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, preferiblemente de 5000 a 40000 Da, y más preferiblemente de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en concreto en función del uso pretendido para el producto, por ejemplo, la capacidad para localizarse en determinados tejidos tales como tumores o de extender la vida media en circulación (para una revisión véase Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545). Por tanto, por ejemplo, cuando el producto esté destinado a abandonar la circulación y penetrar en un tejido, por ejemplo, para uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de mayor peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tal como poli(etilenglicol) o, especialmente un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado del mismo, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

En un ejemplo, los anticuerpos para uso en la presente invención se unen a grupos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden unirse a través de cualquier aminoácido disponible en la cadena lateral o de cualquier grupo funcional aminoácido terminal, localizados en el fragmento del anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden existir de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden introducirse en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase por ejemplo las Patentes de EE.UU. nº 5.219.996; 5.667.425, y el documento WO 98/25971). En un ejemplo la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región de bisagra que contiene uno o más residuos de cisteína, a los cuales se puede unir la molécula efectora. Se pueden usar sitios múltiples para unir dos o más moléculas de PEG.

Preferiblemente, las moléculas de PEG se unen covalentemente mediante un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar ligada covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína localizado en el fragmento. Generalmente, el enlace covalente será un enlace de disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de anclaje, se pueden usar moléculas efectoras adecuadamente activadas, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidas y derivados de cisteína. Se puede usar un polímero activado como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados con polímero como se ha descrito anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo tiol tal como un ácido ó éster α-halocarboxílico, p.ej., yodoacetamida, una imida, p.ej., maleimida, una sulfona de vinilo o un disulfuro. Dichos materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo en Nektar, antes Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente empleando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen 20K metoxi-PEG-amina (que se puede obtener en Nektar, antes Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (que se puede obtener en Nektar, antes Shearwater).

En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado que está PEGilado, es decir, tiene un PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente, p.ej., según el método descrito en el documento EP 0948544 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54: 531-545]. En un ejemplo se une PEG a una cisteína de la región de bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida ligado covalentemente a un único grupo tiol en una región de bisagra modificada. Se puede ligar covalentemente un residuo de lisina al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amino del residuo de lisina se puede unir un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tenga un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser, por tanto, de aproximadamente 40.000 Da.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por IL-17A humana y por IL-17F humana, que es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 7 y que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada una región de bisagra modificada que contiene al menos un residuo de cisteína al cual se une una molécula efectora.

Preferiblemente, la molécula efectora es PEG y se une usando los métodos descritos en los documentos WO 98/25971 y WO 2004072116, mediante los cuales se une un grupo lisil-maleimida al residuo de cisteína del extremo C-terminal de la cadena pesada, y cada grupo amino del residuo lisilo lleva unido covalentemente un residuo metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. El peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es por tanto de aproximadamente 40.000 Da.

En otro ejemplo se pueden unir moléculas efectoras a los fragmentos de anticuerpo usando los métodos descritos en las Solicitudes de Patente Internacionales WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171.

La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislado que codifica la(s) cadena(s) pesada y/o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido mediante procesamiento químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención pueden obtenerse mediante métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, se pueden sintetizar según se desee secuencias de ADN que codifican para parte o para la totalidad de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo a partir de determinadas secuencias de ADN o en base a las correspondientes secuencias de aminoácido.

El ADN que codifica para secuencias estructurales aceptoras está disponible ampliamente para los especialistas en la técnica y puede sintetizarse fácilmente en base a sus secuencias de aminoácidos conocidas.

Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar secuencias de ADN que codifican para la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden sintetizar las secuencias de ADN deseadas completamente o en parte usando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden usar las técnicas de mutagénesis sito-dirigida y de reacción en cadena de polimerasa (PCR) según se juzgue apropiado.

Los ejemplos de secuencias adecuadas se proporcionan en las SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18. Los nucleótidos 1-57 de la SEQ ID NO: 18 y 1-60 de la SEQ ID NO: 14 codifican la secuencia de péptido señal del anticuerpo de ratón B72.3 (Whittle *et al.*, 1987, Protein Eng. 1(6) 499-505), que se divide para proporcionar una molécula de anticuerpo neutralizante de la presente invención.

La presente invención también se refiere a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, el vector de clonación o expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente. Preferiblemente, un vector según la presente invención comprende las secuencias proporcionadas en la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 18. Los nucleótidos 1-57 de la SEQ ID NO: 18 y 1-60 de la SEQ ID NO: 14 codifican la secuencia de péptido señal del anticuerpo de ratón B72.3 (residuos 1-19 de la SEQ ID NO: 16 y 1-20 de la SEQ ID NO: 12, respectivamente) que lo más preferiblemente es dividido para producir una molécula de anticuerpo neutralizante de la presente invención.

Los métodos generales mediante los cuales se construyen los vectores, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los especialistas en la técnica. A este respecto, se hace referencia a “Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F. M. Ausubel (ed.), Wiley Interscience, Nueva York, y el Manual Maniatis producido por Cold Spring Harbor Publishing.

También se proporciona una célula hospedante que comprende uno o más vectores de clonación o de expresión que comprenden una o más secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Se pueden usar sistemas bacterianos, por ejemplo de *E. coli*, y otros sistemas microbianos, o también se pueden usar sistemas de expresión de células hospedantes eucarióticas, por ejemplo de mamífero. Las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen células CHO, de mieloma y de hibridoma.

La presente invención también proporciona un proceso para la producción de una molécula de anticuerpo según la presente invención que comprende cultivar una célula hospedante que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para dirigir la expresión de proteínas a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender solo un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo es necesario usar una secuencia codificadora de polipéptido de cadena pesada o de cadena ligera para transfectar las células hospedantes. Para la producción de productos que comprenden las cadenas pesada y ligera, la línea celular puede ser transfectada con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede usar un único vector, incluyendo dicho vector secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

Como los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o la profilaxis de una afección

patológica, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o diagnóstica que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo, farmacéuticamente aceptables. Por consiguiente, se proporciona el uso de un anticuerpo según la presente invención para la fabricación de un medicamento. La composición se suministrará habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende la adición y la mezcla de la molécula de anticuerpo de la presente invención con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo de la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede ir acompañada de otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpo, por ejemplo anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1β, anti-células T, anti-IFNγ o anti-LPS, o ingredientes que no sean anticuerpos, tal como xantinas.

Las composiciones farmacéuticas preferiblemente comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la invención. El término “cantidad terapéuticamente efectiva” tal como se usa en la presente memoria se refiere a una cantidad necesaria de un agente terapéutico para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad o afección objetivo, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente bien en ensayos de cultivo celular o en modelos de animales, normalmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo de animal también puede usarse para determinar el rango de concentración y la ruta de administración apropiados. Dicha información puede usarse entonces para determinar las dosis y rutas útiles para la administración en humanos.

La cantidad terapéuticamente efectiva precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado de enfermedad, de la salud general del sujeto, de la edad, del peso y del género del sujeto, de la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración, de la(s) combinación(es) de fármacos, de las sensibilidades de reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Dicha cantidad se puede determinar mediante experimentación rutinaria y queda a discreción del médico responsable. De forma general, una cantidad terapéuticamente efectiva estará entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de forma conveniente en formas de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.

Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (p.ej., simultáneamente, secuencialmente o por separado) junto a otros agentes, fármacos u hormonas.

La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, del grado de inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo está siendo usada profilácticamente o para tratar una afección existente.

La frecuencia de dosis dependerá de la vida media de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una vida media corta (p.ej., de 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una vida media larga (p.ej., de 2 a 15 días) puede ser necesario administrar solamente una dosis al día, una dosis a la semana o incluso una dosis cada 1 ó 2 meses.

El vehículo farmacéuticamente aceptable no debería inducir por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición y no debería ser tóxico. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes de metabolismo lento, tal como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.

Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de ácidos minerales, tal como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tal como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables de las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, salino, glicerol y etanol. Adicionalmente, puede haber presentes sustancias auxiliares en dichas composiciones, tal como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH. Dichos vehículos permiten que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como comprimidos, píldoras, pastillas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes y suspensiones, para ingestión por el paciente.

Las formas preferidas para administración incluyen las formas adecuadas para administración parenteral, p.ej., mediante inyección o infusión, por ejemplo mediante inyección de bolo o infusión continua. Cuando el producto es para inyección o infusión, puede adoptar la forma de una suspensión, disolución o emulsión en un vehículo oleaginoso o acuoso y puede contener agentes de formulación, tal como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede encontrarse en forma seca, para

reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales. Sin embargo, se prefiere que las composiciones estén adaptadas para administración a sujetos humanos.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a través de una serie de rutas que incluyen, aunque sin limitación, la ruta oral, intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. También se puede usar hipopulverizadores para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como preparaciones inyectables, tanto en forma de disoluciones líquidas como de suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución, o suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección.

La administración directa de las composiciones generalmente se llevará a cabo mediante inyección, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente o intramuscularmente, o se administrará al espacio intersticial de un tejido. Las composiciones también pueden administrarse en una lesión. El tratamiento de dosis puede ser un calendario de dosis única o un calendario de dosis múltiples.

Cabe destacar que el ingrediente activo de la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición va a administrarse a través de una ruta que use el tracto gastrointestinal, será necesario que la composición contenga agentes que protejan al anticuerpo frente a la degradación, pero que liberen al anticuerpo una vez absorbido del tracto gastrointestinal.

Una discusión exhaustiva de vehículos farmacéuticamente aceptables puede encontrarse en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” (Mack Publishing Company, N.J., 1991).

También se contempla que el anticuerpo de la presente invención sea administrado mediante el uso de terapia génica. A fin de conseguirlo, se introducen en un paciente secuencias de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes de ADN apropiados, de tal modo que las cadenas de anticuerpo son expresadas a partir de las secuencias de ADN y se constituyen *in situ*.

La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo para uso en el control de enfermedades inflamatorias. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo puede usarse para reducir el proceso inflamatorio o para prevenir el proceso inflamatorio.

La presente invención también proporciona la molécula de anticuerpo de la presente invención para uso en el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico que esté mediado por IL-17A y/o por IL-17F, o que esté asociado a un nivel incrementado de IL-17A y/o de IL-17F. Preferiblemente, la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), el choque endotóxico asociado a infección, artritis, artritis reumatoide, asma, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerativa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celiaca, enfermedad de vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, soriasis, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, apoplejía, diabetes de tipo I, artritis de Lyme, meningoencefalitis, trastornos inflamatorios de origen inmune del sistema nervioso central y periférico, tal como esclerosis múltiple y síndrome de Guillain-Barr, otros trastornos autoinmunes, pancreatitis, trauma (cirugía), enfermedad de injerto-contra-hospedante, rechazo de trasplante, cáncer (tanto tumores sólidos como melanomas, hepatoblastomas, sarcomas, carcinomas de célula escamosa, cánceres de células transicionales, cánceres de ovario y malignidades hematológicas, y en particular leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, cáncer gástrico y cáncer de colon), enfermedad cardiaca que incluye enfermedades isquémicas tales como infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, reabsorción ósea, osteoporosis, periodontitis e hipoclorhidria.

La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo según la presente invención para uso en el tratamiento o la profilaxis del dolor.

La presente invención proporciona además el uso de una molécula de anticuerpo según la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno patológico que está mediado por IL-17A y/o IL-17F, o que está asociado a un nivel incrementado de IL-17A y/o de IL-17F. Preferiblemente, el trastorno patológico es artritis reumatoide o esclerosis múltiple.

La presente invención proporciona además el uso de una molécula de anticuerpo según la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis del dolor.

Una molécula de anticuerpo de la presente invención puede ser utilizada en cualquier terapia en la que se desee reducir los efectos de IL-17A y/o de IL-17F en el cuerpo humano o de un animal. La IL-17A y/o la IL-17F pueden estar en circulación en el cuerpo o pueden estar presentes en un nivel indeseablemente elevado localizadas en un sito concreto del cuerpo, por ejemplo en una zona de inflamación.

Una molécula de anticuerpo según la presente invención se usa preferiblemente para el control de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes o cáncer.

La presente invención también proporciona un método para tratar sujetos humanos o animales que padecen o que están en riesgo de padecer un trastorno mediado por IL-17A y/o IL-17F, comprendiendo dicho método la administración a un sujeto de una cantidad efectiva de una molécula de anticuerpo de la presente invención.

Una molécula de anticuerpo según la presente invención se usa también en diagnosis, por ejemplo en diagnosis *in vivo* y en técnicas de imagen de estados de enfermedad que implican IL-17A y/o IL-17F.

La presente invención se describe adicionalmente, meramente a modo ilustrativo, en los siguientes ejemplos, que están referidos a las Figuras acompañantes, en las que:

Figura 1:

a) Región V de cadena ligera del anticuerpo CA028_0496 (SEQ ID NO: 7)

b) Región V de cadena pesada del anticuerpo CA028_0496 (SEQ ID NO: 9)

c) CDRH1 (SEQ ID NO: 1), CDRH2 (SEQ ID NO: 2), CDRH3 (SEQ ID NO: 3), CDRL1 (SEQ ID NO: 4), CDRL2 (SEQ ID NO: 5), CDRL3 (SEQ ID NO: 6) del anticuerpo CA028_496.

d) Cadena ligera del anticuerpo CA028_496 (SEQ ID NO: 11).

e) Cadena pesada del anticuerpo CA028_496 (SEQ ID NO: 15).

f) ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo CA028_496 que incluye la secuencia señal (SEQ ID NO: 14).

g) ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo CA028_496 que incluye la secuencia señal (SEQ ID NO: 18).

Figura 2:

a) Efecto del anticuerpo CA028_0496 (designado Ab#496 en la leyenda) sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17 humana en células Hela.

b) Efecto del anticuerpo CA028_0496 (designado Ab#496 en la leyenda) sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17F humana en células Hela.

Manipulaciones de ADN y métodos generales

Se usó la cepa de *E. coli* INVαF' (Invitrogen) para la transformación y el crecimiento de cultivo rutinario. Las enzimas de restricción y modificación de ADN fueron obtenidas en Roche Diagnostics Ltd. y en New England Biolabs. Las preparaciones de plásmido se llevaron a cabo usando kits de purificación Maxi Plasmid (QIAGEN, nº de catálogo 12165). Las reacciones de secuenciamiento de ADN se llevaron a cabo usando el kit de secuenciamiento ABI Prism Big Dye terminator (nº de catálogo 4304149) y se ejecutaron en un secuenciador automatizado ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados usando el programa AutoAssembler (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos se obtuvieron en Invitrogen. La concentración de IgG fue determinada usando ELISA de montaje de IgG.

Isoformas de IL-17

La IL-17A y la IL-17F recombinantes fueron adquiridas en R&D Systems.

El heterodímero IL-17A/F recombinante fue producido uniendo IL-17A e IL-17F con un ligando GS. El heterodímero presentaba la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 19).

MGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRN

EDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEK

ILVSVGCTCVTPIVHHVA**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**RKIPKVGHTFFQKPESCP

PVPGGSMKLDIGIINENQRVSMSRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQCRNL

GCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQGCSVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVIHHV Q

IL-17F recombinante de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 20)

MRKIPKVGHTFFQKPESCPPVPEGSMKLDTGIINENQRVSMSRNIESRSTSPWNYTVTWDPN

RYPSEVVQAQCKHLGCINAQGKEDISMNSVPIQQETLVLRRKHQGCSVSFQLEKVLVTVGCT CVTPVIHHVQ

La secuencia de ADN que codifica el heterodímero IL-17A/F fue sintetizada químicamente por Entelechon GmbH y se subclonó en pET43.1a en los sitios NdeI/XhoI.

Se usó ADN pET43.1a que codifica las isoformas de IL-17 para transfectar células BL21(DE3) y se cultivaron clones resistentes a carbenicilina seleccionados a 37ºC durante una noche en caldo de cultivo 2TY que contenía un 2% de glucosa y 50 µg/mL de carbenicilina. Los cultivos fueron diluidos a continuación y cultivados en el mismo medio hasta una DO_{600} de 0,5-0,7, inducida con IPTG 1 mM y cultivada a 37ºC durante otras 4-5 horas.

Las células fueron recolectadas mediante centrifugación y se prepararon cuerpos de inclusión a partir de las células. Los cuerpos de inclusión fueron solubilizados en Tris-HCl 50 mM, hidrocloruro de guanidinio 5M, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, glutationa reducida 2 mM, glutationa oxidada 0,2 mM, pH 8,5. La proteína IL-17 se replegó mediante la adición gota a gota de la proteína solubilizada al tampón anterior sin hidrocloruro de guanidinio, con fuerte agitación. El volumen final se eligió de tal modo que la concentración de proteínas final no fue superior a 0,1 mg/mL.

La disolución de proteína replegada se concentró según se requiriera, antes de cambiar el tampón por MES 10 mM pH 6. A continuación se aplicó la proteína a una columna de Sepharose SP HP equilibrada con MES 20 mM pH 6. La proteína fue eluída con un gradiente linear de NaCl 0-500 mM en MES pH 6 a lo largo de 10 volúmenes de columna. Para la IL-17F se extendió el gradiente hasta NaCl 600 mM. A fin de purificar adicionalmente la IL-17, se agrupó la fracción relevante de la columna SP HP de Sepharose, se concentró y se diluyó con CAPSO 20 mM (pH 10) y se aplicó a una columna Mono Q equilibrada con CAPSO 20 mM. La proteína fue eluída con un gradiente linear de NaCl 0-250 mM en CAPSO 20 mM a lo largo de 20 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían IL-17 fueron agrupadas y neutralizadas usando MES 1M pH 6.

Ejemplo 1: Producción de un anticuerpo anti-IL-17 neutralizante

Se inmunizaron ratas Sprague Dawly hembras con IL-17 humana recombinante (adquirida en R&D systems). Las ratas recibieron cuatro inmunizaciones de 20 µg de IL-17 en 100 µL de adyuvante de Freund. El anticuerpo 225 que se une a IL-17 humana fue aislado usando los métodos descritos en el documento WO 04/051268. Los genes correspondientes al dominio variable de cadena pesada (VH) y al dominio variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo 225 fueron aislados y secuenciados tras la clonación mediante PCR de transcripción inversa.

Se diseñó una serie de regiones VL y VH humanizadas usando estructuras aceptoras de región V humanas y variando el número de residuos donantes de las regiones estructurales. Se diseñaron ocho regiones VL ancladas (gL1-8) y 9 regiones VH ancladas (gH1-9) y se construyeron los genes mediante montaje de oligonucleótidos y mutagénesis de PCR.

Las secuencias ancladas de cadena ligera fueron sub-clonadas en el vector de expresión de cadena ligera humana pKH10.1 que contiene el ADN que codifica la región constante C-Kappa humana (alotipo Km3). Las secuencias ancladas de cadena pesada fueron sub-clonadas en el vector de expresión gamma-4 humano pVhg4P FL, que contiene el ADN que codifica la región constante gamma-4 humana que contiene la mutación estabilizante de bisagra S241P (Angal *et al.*, ver anterior). Los plásmidos fueron co-transfectados en células CHO y los anticuerpos producidos fueron escrutados en función de su actividad en ensayos de unión y neutralización de IL-17. Se llevaron a cabo transfecciones de células CHO usando el procedimiento Lipofectamine™ 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante (InVitrogen, nº de catálogo 11668).

Se seleccionó el injerto óptimo en base a la expresión, afinidad y potencia de neutralización (gL7gH9) y se denominó CA028_0496. Las secuencias de región V de este anticuerpo se muestran en la Figura 1 (a) y (b) y en las SEQ ID NOs: 7 y 9 para la cadena ligera (gL7) y la cadena pesada (gH9), respectivamente.

La estructura aceptora de cadena pesada es la secuencia de línea germinal humana VH3 1-3 3-07 con estructura 4 procedente de esta porción de JH4 de línea germinal de región JH. La estructura aceptora de cadena ligera es la secuencia de línea germinal humana VK1 2-1-(1) L4, con la estructura 4 procedente de esta porción de la JK1 de línea germinal humana de región JK humana.

Ejemplo 2: el Anticuerpo CA028_0496 neutraliza IL-17 e IL-17F y heterodímero IL-17A/F

Células Hela

Se evaluó la potencia del anticuerpo CA028_0496 contra IL-17 recombinante humana e IL-17F recombinante humana en células Hela y se comparó con el anticuerpo CDP435 (WO 06/054059). Las células Hela fueron obtenidas del banco de células de ATCC (ATCC CCL-2). Las células fueron cultivadas en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal de ternero, penicilina, gentamicina y glutamina. Se llevaron a placa $1x10^4$ células en placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos. Las células fueron incubadas durante una noche y lavadas una vez en tampón de ensayo. Se incubó IL-17A humana (25 ng mL^{-1}) o IL-17F humana (125 ng mL^{-1}) en presencia de una concentración fija de TNF-α humano, dicha mezcla se preincubó con anticuerpo CA028_0496 o con anticuerpo CDP435. A continuación se añadió la citoquina más el anticuerpo a las células Hela, que fueron incubadas durante una noche. La producción de IL-6 en el sobrenadante del cultivo celular era proporcional a la cantidad de IL-17a/IL-17F añadida a las células. Se midieron los niveles de

IL-6 humana mediante ELISA y se cuantificaron por comparación con concentraciones conocidas de patrón de IL-6 humana.

Los datos (Figuras 2a y 2b) indican que el anticuerpo CA028_0496 neutralizó de forma potente la IL-17A recombinante humana, y también presentó algo de actividad contra la IL-17F humana. Los datos de estos experimentos indicaron que el anticuerpo CA028_496 dio lugar a una IC_{50} de 43 ng/mL contra IL-17 recombinante humana (25 ng mL^{-1}) y 1477 ng/mL contra IL-17F recombinante (125 ng mL-1). Por consiguiente, el anticuerpo CA028_0496 proporcionó una IC_{50} de 0,29 M frente a IL-17 recombinante humana (0,78 nM) y de 10,18 nM frente a IL-17F recombinante humana (4,16 nM) en este ensayo (cálculo basado en IgG suponiendo un peso molecular de 145.000 como IgG4 promedio y suponiendo que la IL-17A y la IL-17F eran dímeros).

Células de microglía humanas

Se llevaron a placa células microgiales humanas (TCS Cellworks) en una placa de fondo plano de 96 pocillos a una concentración de 5.000 células por pocillo en un volumen total de 100 µL y se dejaron 24 horas para que se unieran al plástico. En ese momento se añadieron a los pocillos por triplicado valoraciones (5, 1, 0,2 y 0,04 µg/mL) de IL-17A recombinante humana, IL-17F recombinante humana, IL-17F recombinante de mono cynomolgus y heterodímero IL-17A/F recombinante humano, en presencia y en ausencia de 10 ng/mL de TNFα recombinante humano. Los pocillos control no contenían ningún estímulo, IL-17A sola (100 ng/mL), TNFα solo e IL-17A y TNFα juntos. Todas las citoquinas fueron añadidas en un volumen total de 110 µL/pocillo, completando un volumen de pocillo total de 210 µL. En los experimentos que implican anticuerpos, las células fueron llevadas a placa del mismo modo. Tras 24 horas, se añadieron los anticuerpos y las citoquinas al mismo tiempo para proporcionar las concentraciones finales establecidas en un volumen final total de 200 µL.

Después de otras 24 horas de incubación a 37ºC, se recolectaron los sobrenadantes y se congelaron a -20ºC hasta su análisis. Para el análisis, los sobrenadantes fueron diluidos 1/10 y se determinó la IL-6 usando un kit IL-6 MSD humano, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las isoformas de IL-17 evaluadas fueron activas en el ensayo, particularmente en presencia de TNFα.

Se evaluó la potencia del anticuerpo CA028_0496 contra IL-17A recombinante humana y contra IL-17F recombinante humana, IL-17F recombinante de mono cynomolgus y contra heterodímero IL-17A/F recombinante humana en células microgliales, en presencia de TNFα, y se comparó con un anticuerpo de control y un anticuerpo específico de IL-17A usando el método descrito anteriormente.

El anticuerpo de control no presentó efecto sobre la actividad de ninguna de las citoquinas evaluadas.

El anticuerpo CA028_0496 presentó actividad inhibidora frente a las tres citoquinas IL-17, IL-17F e IL-17A/F, incluyendo la IL-17F de mono cynomolgus, mientras que el anticuerpo específico de IL-17A solo presentó actividad inhibidora frente a IL-17A y el heterodímero IL-17A/F.

Ejemplo 3: Afinidad del anticuerpo CA028_0496 (regiones constantes de IgG4 humana) por IL-17A e IL-17F

Se llevó a cabo un BIA (Biomolecular Interaction Analysis) usando un Biacore 3000 (Biacore AB). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25ºC. Se inmovilizó el fragmento Fc Affinipure de IgG anti-humana de cabra, específico de fragmento Fc (Jackson ImmunoResearch) sobre un Chip Sensor CM5 mediante acoplamiento vía amina hasta un nivel de captura de ~6000 unidades de respuesta (URs). Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% de surfactante P20, Biacore AB) como tampón de elución con un caudal de 10 µL/min. Se usó una inyección de 10 µL del anticuerpo CA028_0496 (1,81 mg/mL) para la captura mediante la IgG-Fc anti-humana inmovilizada. Las isoformas IL-17A e IL-17F humanas fueron valoradas sobre el CA028_0496 capturado en diluciones 1 a 2 desde 50 nM hasta sub nM con un caudal de 30 µL/min. La superficie fue regenerada mediante inyecciones de 30 µL de HCl 40 mM, seguidas de una inyección de 5 µL de NaOH 5 mM.

Las curvas de unión con sustracción del fondo fueron doblemente referenciadas y se analizaron usando el software BIAevaluation (versión 3.2) siguiendo procedimientos estándar. Se determinaron los parámetros cinéticos a partir del algoritmo de ajuste.

El valor de afinidad determinado para la unión del anticuerpo CA028_0496 a IL-17A fue de 16 pM y de 1750 pM para la IL-17F. El anticuerpo CA028_0496 no se unió a las otras isoformas de IL-17 (IL-17 B, C, D y E). El anticuerpo CA028_0496 se une, por lo tanto, a IL-17A e IL-17F.

Ejemplo 4: Afinidad del anticuerpo CA028_0496 (regiones constantes de IgG1 de ratón) por IL-17A, IL-17F de mono cynomolgus y heterodímero IL-17A/F

Se llevó a cabo un BIA (Biomolecular Interaction Analysis) usando un Biacore 3000 (Biacore AB). Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25ºC. Se inmovilizó el fragmento $F(ab')_2$ Affinipure de IgG anti-ratón de cabra, específico de fragmento Fc (Jackson ImmunoResearch) sobre un Chip Sensor CM5 mediante acoplamiento vía amina hasta un nivel de captura de ~6000 unidades de respuesta (URs). Se usó tampón HBS-EP (HEPES 10 mM,

pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% de surfactante P20, Biacore AB) como tampón de elución con un caudal de 10 µL/min. Se usó una inyección de 10 µL del anticuerpo CA028_0496 a 4 µg/mL para la captura mediante la IgG-Fc anti-ratón inmovilizada. La IL-17A humana, la IL-17F de mono cynomolgus y el heterodímero A/F fueron valorados sobre el CA028_0496 capturado en diluciones 1 a 2 desde 25 nM hasta sub nM con un caudal de 30 µL/min. La superficie fue regenerada con un caudal de 10 µL/min mediante una inyección de 10 µL de HCl 40 mM, seguida de una inyección de 5 µL de NaOH 5 mM.

Las curvas de unión con sustracción del fondo doblemente referenciadas fueron analizadas usando el software BIAevaluation (versión 3.2) siguiendo procedimientos estándar. Se determinaron los parámetros cinéticos a partir del algoritmo de ajuste.

El anticuerpo CA028_0496 presentó una afinidad de 21 pM por la IL-17A, de 116 pM por el heterodímero IL-17A/F y de 1030 pM por la IL-17F de mono cynomolgus.

Obviamente, debe entenderse que la presente invención ha sido descrita meramente a modo de ejemplo, que en modo alguno pretende ser limitante, y que se pueden realizar modificaciones de detalles que entren dentro del alcance de las reivindicaciones presentadas a continuación.

Listado de secuencias

<110> UCB PHARMA S.A. Adams, Ralph Popplewell, Andrew Rapecki, Stephen

<120> Moléculas de anticuerpo que se unen a IL-17A e IL-17F
<130> G0035-WO01

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Asn Met Ala
1 5 10

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH2

<400> 2
Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRH3

<400> 3
Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe Ala His
1 5 10 15

<210> 4
<211> 11

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDRL1

<400> 4
Arg Ala Asp Glu Ser Val Thr Thr Leu Met His
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 5
Leu Val Ser Asn Arg Glu Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 6
Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> gL7

<400> 7
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asp Glu Ser Val Thr Thr Leu
20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Val Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 8
<211> 324
<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> gL7

<400> 8
gccatccagc tgacccagag cccttcctct ctcagcgcca gtgtcggaga cagagtgact 60

attacctgca gggctgacga aagcgtgacc acattgatgc actggtacca acagaagcct 120

ggcaaagccc ccaagctcct gatctatctg gtttccaatc gggagtctgg agtccccagc 180

aggttcagcg gcagtgggtc tggaactgac tttaccctga caatctcctc actccagccc 240

gaagatttcg ccacctacta ttgccagcag acttggagcg acccttggac atttggacag 300

ggcacaaaag tggagatcaa gcgt 324

<210> 9
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> gH9

<400> 9
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 Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe
100 105 110

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 10
<211> 375
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> gH9

<400> 10

gaggttcagc tcgttgaatc cggaggcgga ctcgtgcagc ctgggggctc cttgcggctg 60

agctgcgctg ccagtggctt cactttcagc gattacaata tggcctgggt gcgccaggcc 120

ccaggcaagg gtctggagtg ggtggccaca attacctatg agggcagaaa cacttattac 180

cgggattcag tgaaagggcg atttaccatc agcagggata atgcaaagaa cagtctgtac 240

ctgcagatga actctctgag agctgaggac accgctgtct actattgtgc aagcccaccc 300

cagtactatg agggctcaat ctacagattg tggtttgccc attggggcca gggaacactg 360

gtgaccgtct cgagc 375

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> GL7+dominio constante

<400> 11
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asp Glu Ser Val Thr Thr Leu

20 25 30

Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Leu Val Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Ser Asp Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12
<211> 234
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Señal+gL7+dominio constante

<400> 12

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asp Glu Ser
35 40 45

Val Thr Thr Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Glu Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp
100 105 110

Ser Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 13
<211> 645
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> gL7+ dominio constante

<400> 13

gccatccagc tgacccagag cccttcctct ctcagcgcca gtgtcggaga cagagtgact 60

attacctgca gggctgacga aagcgtgacc acattgatgc actggtacca acagaagcct 120

ggcaaagccc ccaagctcct gatctatctg gtttccaatc gggagtctgg agtccccagc 180

aggttcagcg gcagtgggtc tggaactgac tttaccctga caatctcctc actccagccc 240

gaagatttcg ccacctacta ttgccagcag acttggagcg acccttggac atttggacag 300

ggcacaaaag tggagatcaa gcgtacggta gcggccccat ctgtcttcat cttcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 14
<211> 705
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> señal+gL7+ dominio constante

<400> 14
atgtcagttc ccacacaggt gctgggcctg cttctgttgt ggctcaccga tgctaggtgt 60

gccatccagc tgacccagag cccttcctct ctcagcgcca gtgtcggaga cagagtgact 120

attacctgca gggctgacga aagcgtgacc acattgatgc actggtacca acagaagcct 180

ggcaaagccc ccaagctcct gatctatctg gtttccaatc gggagtctgg agtccccagc 240

aggttcagcg gcagtgggtc tggaactgac tttaccctga caatctcctc actccagccc 300

gaagatttcg ccacctacta ttgccagcag acttggagcg acccttggac atttggacag 360

ggcacaaaag tggagatcaa gcgtacggta gcggccccat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 15
<211> 452
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> gH9+ dominio constante

<400> 15

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 Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg Asp 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Trp Phe
100 105 110

Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
130 135 140

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Gly Lys
450

<210> 16
<211> 471
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> señal+gH9+dominio constante

<400> 16
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Thr Tyr Glu Gly Arg Asn Thr Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Pro Pro Gln Tyr Tyr Glu Gly Ser Ile Tyr Arg
115 120 125

Leu Trp Phe Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
145 150 155 160

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
165 170 175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
180 185 190

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
195 200 205

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
210 215 220

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
225 230 235 240

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
340 345 350

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
465 470

<210> 17
<211> 1963
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> gH9+dominio constante

<400> 17
gaggttcagc tcgttgaatc cggaggcgga ctcgtgcagc ctgggggctc cttgcggctg 60

agctgcgctg ccagtggctt cactttcagc gattacaata tggcctgggt gcgccaggcc 120

ccaggcaagg gtctggagtg ggtggccaca attacctatg agggcagaaa cacttattac 180

cgggattcag tgaaagggcg atttaccatc agcagggata atgcaaagaa cagtctgtac 240

ctgcagatga actctctgag agctgaggac accgctgtct actattgtgc aagcccaccc 300

cagtactatg agggctcaat ctacagattg tggtttgccc attggggcca gggaacactg 360

gtgaccgtct cgagcgcttc tacaaagggc ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc 420

aggagcacct ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa 480

ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct 540

gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc 600

ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac 660

aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag ccaggctcag 720

ccctcctgcc tggacgcacc ccggctgtgc agccccagcc cagggcagca aggcatgccc 780

catctgtctc ctcacccgga ggcctctgac caccccactc atgcccaggg agagggtctt 840

ctggattttt ccaccaggct ccgggcagcc acaggctgga tgcccctacc ccaggccctg 900

cgcatacagg ggcaggtgct gcgctcagac ctgccaagag ccatatccgg gaggaccctg 960

cccctgacct aagcccaccc caaaggccaa actctccact ccctcagctc agacaccttc 1020

tctcctccca gatctgagta actcccaatc ttctctctgc agagtccaaa tatggtcccc 1080

catgcccacc atgcccaggt aagccaaccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca 1140

ggtgccctag agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgctga cgcatccacc 1200

tccatctctt cctcagcacc tgagttcctg gggggaccat cagtcttcct gttccccccca 1260

aaacccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 1320

gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat 1380

aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 1440

ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1500

aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggtgg gacccacggg 1560

gtgcgagggc cacatggaca gaggtcagct cggcccaccc tctgccctgg gagtgaccgc 1620

tgtgccaacc tctgtcccta cagggcagcc ccgagagcca caggtgtaca ccctgccccc 1680

atcccaggag gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta 1740

ccccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac 1800

cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaggc taaccgtgga 1860

caagagcagg tggcaggagg ggaatgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca 1920

caaccactac acacagaaga gcctctccct gtctctgggt aaa 1963

<210> 18
<211> 2020
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> señal+gH9+dominio constante

<400> 18
atggaatggt cctgggtctt cctgtttttc ctttctgtca caaccggggt gcacagcgag 60

gttcagctcg ttgaatccgg aggcggactc gtgcagcctg ggggctcctt gcggctgagc 120

tgcgctgcca gtggcttcac tttcagcgat tacaatatgg cctgggtgcg ccaggcccca 180

ggcaagggtc tggagtgggt ggccacaatt acctatgagg gcagaaacac ttattaccgg 240

gattcagtga aagggcgatt taccatcagc agggataatg caaagaacag tctgtacctg 300

cagatgaact ctctgagagc tgaggacacc gctgtctact attgtgcaag cccaccccag 360

tactatgagg gctcaatcta cagattgtgg tttgcccatt ggggccaggg aacactggtg 420

accgtctcga gcgcttctac aaagggccca tccgtcttcc ccctggcgcc ctgctccagg 480

agcacctccg agagcacagc cgccctgggc tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg 540

gtgacggtgt cgtggaactc aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc 600

ctacagtcct caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ccgtgccctc cagcagcttg 660

ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag 720

agagttggtg agaggccagc acagggaggg agggtgtctg ctggaagcca ggctcagccc 780

tcctgcctgg acgcaccccg gctgtgcagc cccagcccag ggcagcaagg catgccccat 840

ctgtctcctc acccggaggc ctctgaccac cccactcatg cccagggaga gggtcttctg 900

gatttttcca ccaggctccg ggcagccaca ggctggatgc ccctacccca ggccctgcgc 960

atacaggggc aggtgctgcg ctcagacctg ccaagagcca tatccgggag gaccctgccc 1020

ctgacctaag cccaccccaa aggccaaact ctccactccc tcagctcaga caccttctct 1080

cctcccagat ctgagtaact cccaatcttc tctctgcaga gtccaaatat ggtcccccat 1140

gcccaccatg cccaggtaag ccaacccagg cctcgccctc cagctcaagg cgggacaggt 1200

gccctagagt agcctgcatc cagggacagg ccccagccgg gtgctgacgc atccacctcc 1260

atctcttcct cagcacctga gttcctgggg ggaccatcag tcttcctgtt ccccccaaaa 1320

cccaaggaca ctctcatgat ctcccggacc cctgaggtca cgtgcgtggt ggtggacgtg 1380

agccaggaag accccgaggt ccagttcaac tggtacgtgg atggcgtgga ggtgcataat 1440

gccaagacaa agccgcggga ggagcagttc aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 1500

accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 1560

ggcctcccgt cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aaggtgggac ccacggggtg 1620

cgagggccac atggacagag gtcagctcgg cccaccctct gccctgggag tgaccgctgt 1680

gccaacctct gtccctacag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc 1740

ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc 1800

cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac 1860

gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa 1920

gagcaggtgg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa 1980

ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa 2020

<210> 19
<211> 286
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223>heterodímero IL-17A/F

<400> 19
Met Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp
1 5 10 15

Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg
20 25 30

Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser
35 40 45

Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro
50 55 60

Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala
65 70 75 80

Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu
85 90 95

Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg
100 105 110

Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile
115 120 125

Val His His Val Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly
145 150 155 160

His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro Pro Val Pro Gly Gly
165 170 175

Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser
180 185 190

Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr
195 200 205

Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln
210 215 220

Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser
225 230 235 240

Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu Val Val Arg Arg Lys
245 250 255

His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr
260 265 270

Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His His Val Gln
275 280 285

<210> 20
<211> 134
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cynomolgus IL-17F

<400> 20
Met Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu
1 5 10 15

Ser Cys Pro Pro Val Pro Glu Gly Ser Met Lys Leu Asp Thr Gly Ile
20 25 30

Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg
35 40 45

Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr
50 55 60

Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Lys His Leu Gly Cys Ile Asn
65 70 75 80

Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln
85 90 95

Glu Thr Leu Val Leu Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe
100 105 110

Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro
115 120 125

Val Ile His His Val Gln
130

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana, que tiene una afinidad de unión a IL-17F mejor que 2 nM y una afinidad de unión a IL-17A mejor que 100 pM, medida mediante resonancia de plasmón superficial.

2. Un anticuerpo neutralizante según la reivindicación 1, que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 1 para CDR-H1, la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 2 para CDR-H2 y la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 3 para CDR-H3.

3. Un anticuerpo neutralizante según la reivindicación 2, que comprende adicionalmente una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

4. Un anticuerpo neutralizante según la reivindicación 3, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 4 para CDR-L1, la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-L2 y la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-L3.

5. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la cadena pesada comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 9.

6. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde la cadena ligera comprende la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 7.

7. Un anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana según la reivindicación 1, que bloquea de forma cruzada la unión de un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de cadena ligera proporcionada en la SEQ ID NO: 7 a IL-17A humana y a IL-17F humana, y que inhibe la unión de un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 9 a IL-17A humana y a IL-17F humana en más de un 80% usando ELISA de competición o resonancia de plasmón superficial.

8. Un anticuerpo neutralizante que se une a IL-17A humana y a IL-17F humana según la reivindicación 1 o la reivindicación 7, que es bloqueado de forma cruzada para la unión a IL-17A humana y a IL-17F humana por un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ IDN NO: 9 y la secuencia de cadena ligera proporcionada en la SEQ ID NO: 7, y en donde el anticuerpo está inhibido para la unión a IL-17A humana y a IL-17F humana por un anticuerpo que comprende la secuencia de cadena pesada proporcionada en la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de cadena ligera proporcionada en la SEQ ID NO: 7 en más de un 80% usando ELISA de competición o resonancia de plasmón superficial.

9. El anticuerpo neutralizante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo es un anticuerpo completo o fragmento o derivado del mismo funcionalmente activo.

10. El anticuerpo según la reivindicación 9, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, multi-valente, multi-específico, humanizado o quimérico, anticuerpo de cadena sencilla, fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento $F(ab')_2$ o un fragmento de unión a epítopo de los mismos.

11. El anticuerpo según la reivindicación 10, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo anclado a CDR, o un anticuerpo completamente humano.

12. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se conjuga a una o más moléculas efectoras.

13. Una secuencia de ADN aislado que codifica las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

14. Un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN según la reivindicación 13.

15. Una célula hospedante que comprende uno o más vectores de clonación o expresión según la reivindicación 14.

16. Un proceso para la producción del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 15 y aislar el anticuerpo.

17. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

18. Una composición farmacéutica según la reivindicación 17, que comprende adicionalmente otros ingredientes

activos.

19. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una composición farmacéutica según la reivindicación 17 o la reivindicación 18, para uso en terapia.

Figura 1

(a) Región variable de cadena ligera de anticuerpo CA028_496 (SEQ ID NO: 7)

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRADESVTTLMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNRESGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIKR

(b) Región variable de cadena pesada de anticuerpo CA028_496 (SEQ ID NO: 9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGTLVTVS
S

(c)

CDRH1: GFTFSDYNMA (SEQ ID NO:1)
CDRH2: TITYEGRNTYYRDSVKG (SEQ ID NO:2)
CDRH3: PPQYYEGSIYRLWFAH (SEQ ID NO:3)
CDRL1: RADESVTTLMH (SEQ ID NO:4)
CDRL2: LVSNRES (SEQ ID NO:5)
CDRL3: QQTWSDPWT (SEQ ID NO:6)

(d) Cadena ligera de anticuerpo CA028_496 (SEQ ID NO: 11)

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRADESVTTLMHWYQQKPGKAPKLLIYLVSNRESGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTWSDPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(e) Cadena pesada de anticuerpo CA028_496 (SEQ ID NO: 15)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPGKGLEWVATITYEGRNTYYRD
SVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPPQYYEGSIYRLWFAHWGQGTLVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSLGK

(f) ADN que codifica la cadena ligera del anticuerpo CA028_496 que incluye la secuencia señal (SEQ ID NO: 14)

atgtcagttcccacacaggtgctgggcctgcttctgttgtggctcaccgatgctaggtgtgc
catccagctgacccagagcccttcctctctcagcgccagtgtcggagacagagtgactatta
cctgcagggctgacgaaagcgtgaccacattgatgcactggtaccaacagaagcctggcaaa
gcccccaagctcctgatctatctggtttccaatcgggagtctggagtccccagcaggttcag
cggcagtgggtctggaactgactttaccctgacaatctcctcactccagcccgaagatttcg
ccacctactattgccagcagacttggagcgacccttggacatttggacagggcacaaaagtg
gagatcaagcgtacggtagcggccccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagtt
gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcag
gacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga

Figura 1 (continuación)

gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaaga
gcttcaacaggggagagtgttag

(g) ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo CA028_496 que incluye la secuencia señal (SEQ ID NO: 18)

atggaatggtcctgggtcttcctgtttttcctttctgtcacaaccggggtgcacagcgaggt
tcagctcgttgaatccggaggcggactcgtgcagcctgggggctccttgcggctgagctgcg
ctgccagtggcttcactttcagcgattacaatatggcctgggtgcgccaggccccaggcaag
ggtctggagtgggtggccacaattacctatgagggcagaaacacttattaccgggattcagt
gaaagggcgatttaccatcagcagggataatgcaaagaacagtctgtacctgcagatgaact
ctctgagagctgaggacaccgctgtctactattgtgcaagcccaccccagtactatgagggc
tcaatctacagattgtggtttgcccattggggccagggaacactggtgaccgtctcgagcgc
ttctacaaagggcccatccgtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagca
cagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaac
tcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactcta
ctccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgca
acgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttggtgagaggccagcacag
ggagggagggtgtctgctggaagccaggctcagccctcctgcctggacgcaccccggctgtg
cagccccagcccagggcagcaaggcatgccccatctgtctcctcacccggaggcctctgacc
accccactcatgcccagggagagggtcttctggatttttccaccaggctccgggcagccaca
ggctggatgcccctaccccaggccctgcgcatacaggggcaggtgctgcgctcagacctgcc
aagagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaagcccaccccaaaggccaaactctcc
actccctcagctcagacaccttctctcctcccagatctgagtaactcccaatcttctctctg
cagagtccaaatatggtcccccatgcccaccatgcccaggtaagccaacccaggcctcgccc
tccagctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgcatccagggacaggccccagccgg
gtgctgacgcatccacctccatctcttcctcagcacctgagttcctgggggggaccatcagtc
ttcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggacccctgaggtcacgtg
cgtggtggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcg
tggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtg
gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgcaaggt
ctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggtgggaccc
acggggtgcgagggccacatggacagaggtcagctcggcccaccctctgccctgggagtgac
cgctgtgccaacctctgtccctacagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgcccc
catcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctac
cccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac
gcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaggctaaccgtggacaaga
gcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac
tacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa

gaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcag
gacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga

Figura 2a

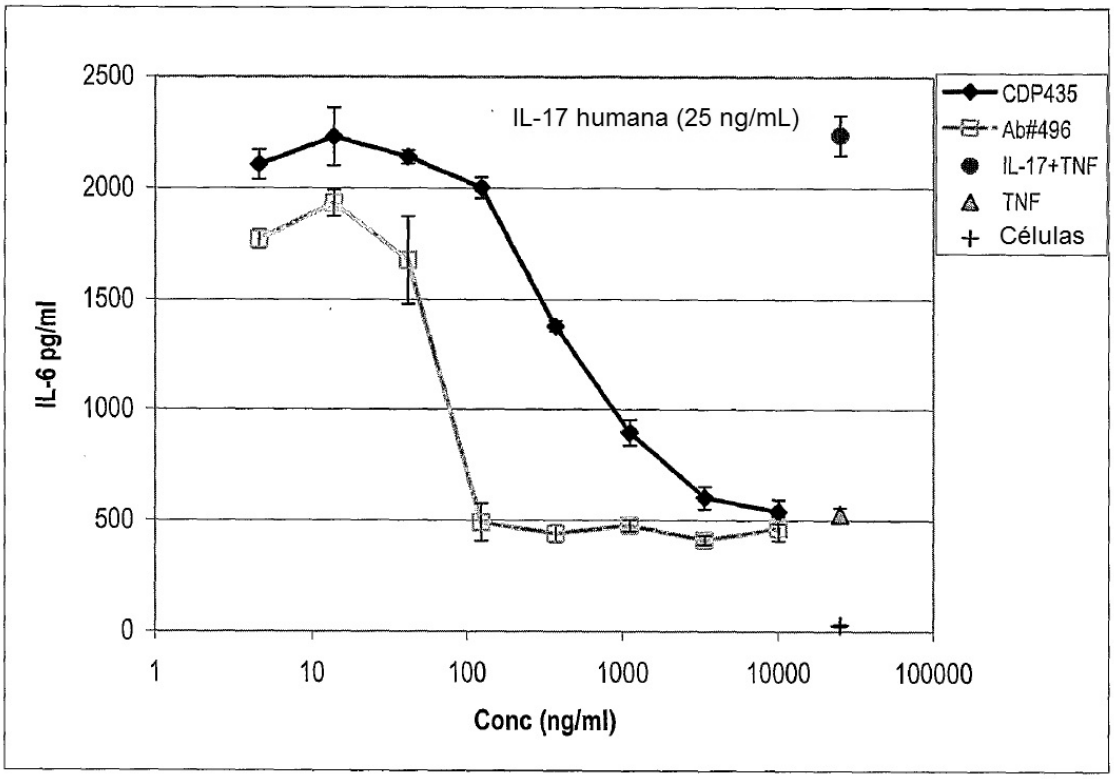
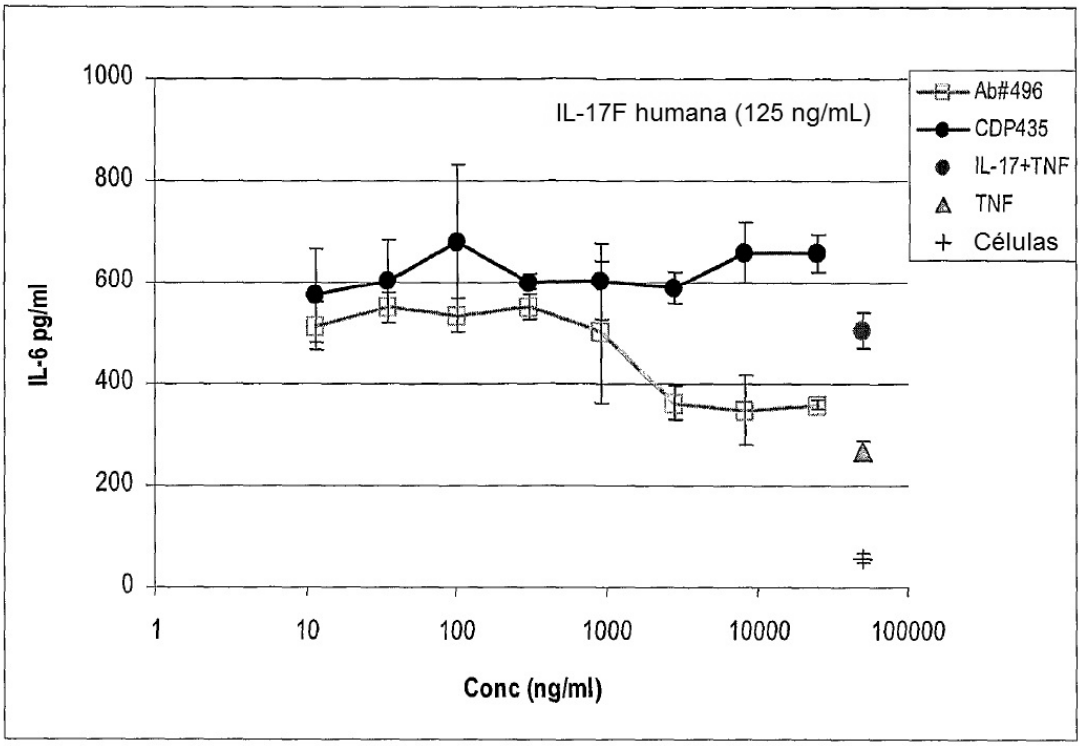

IL-17 humana (25 ng/mL)
CDP435
Ab#496
IL-17+TNF
TNF
Células
IL-6 pg/ml
2500
2000
1500
1000
500
0
1
10
100
1000
10000
100000
Conc (ng/ml)

Figura 2b


IL-17F humana (125 ng/mL)
Ab#496
CDP435
IL-17+TNF
TNF
Células
IL-6 pg/ml
1000
800
600
400
200
0
1
10
100
1000
10000
100000
Conc (ng/ml)