

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 603**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2013 PCT/US2013/047500**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14004436**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2013 E 13808570 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 2866833**

54 Título: **Anticuerpos IL-23 antihumanos cristalinos**

30 Prioridad:

27.06.2012 US 201261665172 P

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

05.11.2019

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**REICHERT, PAUL;
PROSISE, WINIFRED, W.;
ORTH, PETER;
NARASIMHAN, CHAKRAVARTHY y
KASHI, RAMESH, S.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 729 603 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos IL-23 antihumanos cristalinos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a formas cristalinas de anticuerpos específicos para interleuquina-23 humana y sus usos. Más específicamente, la invención se refiere a formas cristalinas de anticuerpos que reconocen IL-23p19 humana y modulan su actividad, particularmente en trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y proliferativos.

10

Antecedentes de la invención

El sistema inmunitario funciona para proteger a los individuos de agentes infecciosos, por ejemplo, bacterias, organismos multicelulares y virus, así como de cánceres. Este sistema incluye varios tipos de células linfoides y mieloides como los monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC), eosinófilos, células T, células B y neutrófilos. Estas células linfoides y mieloides a menudo producen proteínas de señalización conocidas como citoquinas. La respuesta inmunitaria incluye inflamación, es decir, la acumulación de células inmunes sistémicamente o en una ubicación particular del cuerpo. En respuesta a un agente infeccioso o sustancia extraña, las células inmunitarias secretan citoquinas que, a su vez, modulan la proliferación, el desarrollo, la diferenciación o la migración de las células inmunitarias. La respuesta inmunitaria puede producir consecuencias patológicas, por ejemplo, cuando involucra una inflamación excesiva, como en los trastornos autoinmunitarios (ver, por ejemplo, Abbas et al. (eds.) (2000) Cellular and Molecular Immunology, W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA; Oppenheim and Feldmann (eds.) (2001) Cytokine Reference, Academic Press, San Diego, CA; von Andrian and Mackay (2000) New Engl. J. Med. 343:1020-1034; Davidson and Diamond (2001) New Engl. J. Med. 345:340-350).

15

20

25

La interleuquina-12 (IL-12) es una molécula heterodimérica compuesta de subunidades p35 y p40. Los estudios han indicado que la IL-12 desempeña una función crítica en la diferenciación de las células T nultitradas en linfocitos T CD4⁺ auxiliar tipo 1 que secretan IFN γ . También se ha demostrado que la IL-12 es esencial para las respuestas inmunitarias e inflamatorias dependientes de las células T in vivo. Véase, por ejemplo, Cua et al. (2003) Nature 421: 744-748. El receptor de IL-12 está compuesto de subunidades IL-12R β 1 e IL-12R β 2.

30

La interleuquina-23 (IL-23) es una citoquina heterodimérica compuesta por dos subunidades, p19 que es exclusiva de IL-23, y p40, que se comparte con IL-12. La subunidad p19 está relacionada estructuralmente con la IL-6, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y la subunidad p35 de la IL-12. IL-23 media la señalización mediante la unión a un receptor heterodimérico, compuesto por IL-23R e IL-12R β 1, que es compartido por el receptor de IL-12. Una serie de estudios iniciales demostraron que las consecuencias de una deficiencia genética en p40 (ratón p40 modificado; ratón p40KO) fueron más graves que las encontradas en un ratón p35KO. Algunos de estos resultados fueron finalmente explicados por el descubrimiento de IL-23, y el hallazgo de que el p40KO evita la expresión no solo de IL-12, sino también de IL-23 (ver, por ejemplo, Oppmann et al. (2000) Immunity 13:715-725; Wiekowski et al. (2001) J. Immunol. 166:7563-7570; Parham et al. (2002) J. Immunol. 168:5699-708; Frucht (2002) Sci STKE 2002, E1-E3; Elkins et al. (2002) Infection Immunity 70:1936-1948).

35

40

Estudios recientes, a través del uso de ratones p40 KO, han demostrado que el bloqueo tanto de IL-23 como de IL-12 es un tratamiento eficaz para varios trastornos inflamatorios y autoinmunitarios. Sin embargo, el bloqueo de IL-12 a p40 parece tener varias consecuencias sistémicas, como una mayor susceptibilidad a infecciones microbianas oportunistas. Bowman et al. (2006) Curr. Opin. Infectar. Dis. 19:245.

45

Los anticuerpos terapéuticos se pueden usar para bloquear la actividad de las citoquinas. La administración subcutánea es el método preferido de administración de muchos de estos anticuerpos, al menos en parte porque permite la autoadministración. Los anticuerpos terapéuticos se preparan tradicionalmente en forma liofilizada o en solución. Las formas liofilizadas pueden mostrar una mayor estabilidad a largo plazo, pero requieren reconstitución antes de su uso, lo que las hace menos que ideales para la autoadministración. Las formulaciones de soluciones no requieren reconstitución, pero pueden sufrir una estabilidad reducida y, por lo general, requieren almacenamiento en frío antes de su uso. Las formulaciones tanto liofilizadas como en solución pueden no proporcionar concentraciones suficientemente altas para permitir el suministro de dosis altas por administración subcutánea. Las formulaciones de solución de alta concentración, si se pueden lograr, también pueden ser propensas a abandonar la solución, o pueden ser demasiado viscosas para ser suministradas en una aguja de calibre estrecho, por ejemplo, según sea necesario para la administración subcutánea, particularmente la autoadministración.

50

55

Ejemplos de anticuerpos diseñados para IL-23p19 se divulgan en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. Asignadas comúnmente Nos. 2010/0272731 y 2010/0111966, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. Nos. 2007/0009526 y 2007/0048315, y en la Publicación de Patente de EE. WO 2007/076524, WO 2007/024846 y WO 2007/147019. Un anticuerpo antagonista de IL-23, ustekinumab (STELARA®), está disponible comercialmente, pero se une a la subunidad p40 de IL-23 en lugar de a la subunidad p19. Como resultado, el ustekinumab también inhibe la actividad de la IL-12, que generalmente es un efecto secundario no deseado que puede conducir a una mayor susceptibilidad de ciertas infecciones y tumores. Bowman et al. (2006) Curr. Opin. Infectar. Dis.

60

65

19:245. Briakinumab, otro anticuerpo anti-p40 que ha entrado en ensayos clínicos, tiene los mismos problemas de seguridad. El anticuerpo antihumano IL-23p19 guselkumab (CNTO-1959) ha entrado en ensayos clínicos.

5 Existe la necesidad de formulaciones mejoradas de anticuerpos anti-huIL-23p19 para su uso, por ejemplo, en el tratamiento de trastornos inflamatorios, autoinmunitarios y proliferativos. Preferiblemente, tales formulaciones de anticuerpos no requerirán reconstitución antes de la administración. Además, tales formulaciones permitirán una administración de mayor concentración del anticuerpo de lo que sería fácilmente alcanzable usando formulaciones en solución típicas, y preferiblemente soportarán altas concentraciones con una viscosidad suficientemente baja para ser administradas convenientemente por vía subcutánea. Dichas formulaciones también pueden proporcionar una liberación sostenida, y también serán más estables que las formulaciones en solución típicas.

15 Una forma cristalina del anticuerpo, ABT-874, se divulga en el documento WO2008/121301. ABT-874, también conocido como Briakinumab, es un anticuerpo anti-IL-12/IL-23 (Ding et al., Current opinion in Investigational drugs, current drugs, London, Vol 9, no 5, 515-522).

Un fragmento fab del anticuerpo, h13B8b, que se ha cristalizado en complejo con IL-23, para uso en estudios de cristalografía se describe en el documento WO2008/103432.

20 La cristalización de los anticuerpos, rituximab, transtuzumab e infliximab, se describe en Yang et al., Proceedings of the national academy of sciences, US, Vol 100, no 12, 6934-6939. Además, la cristalización de los anticuerpos anti-TNF α , D2E7 y MAK195f (Afeliomab) se describen en los documentos WO2008/057240 y WO2009/020654, respectivamente.

Resumen de la invención

25 La presente invención satisface estas necesidades y más proporcionando formas cristalinas de anticuerpos anti-huIL-23, tales como anticuerpos que se unen a la subunidad p19 de IL-23 humana (anticuerpos anti-IL-23p19 humanos). En un aspecto, la invención se refiere a formas cristalinas de anticuerpos anti-huIL-23, tales como anticuerpos anti-huIL-23p19.

30 a) un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en el que:

35 i) CDRL1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10;

ii) CDRL2 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11; y

iii) CDRL3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12;

40 y

b) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en el que:

45 i) CDRH1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5;

ii) CDRH2 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 6-8; y

50 iii) CDRH3 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9.

En otro aspecto, la invención se refiere a suspensiones de las formas cristalinas de anticuerpos anti-huIL-23p19, por ejemplo, como lodos cristalinos. En otro aspecto más, la invención se refiere a formulaciones farmacéuticas que comprenden la forma cristalina del anticuerpo anti-huIL-23p19. En diversas realizaciones, la forma cristalina de los anticuerpos anti-huIL-23, como los anticuerpos anti-huIL-23p19, se usa para facilitar la purificación, el almacenamiento y la administración terapéutica del anticuerpo anti-huIL-23.

60 En algunas realizaciones, los cristales de anticuerpos anti-huIL-23, tales como los cristales de anticuerpos anti-huIL-23p19, de la presente invención tienen un tamaño de partícula promedio entre cinco y 200 micras. En otras realizaciones, los cristales de anticuerpos anti-huIL-23, tales como los cristales de anticuerpos anti-huIL-23p19, se caracterizan por dimensiones celulares unitarias de $a = b = 192 \text{ \AA}$, $c = 106 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ y están en el grupo 14 de espacio. En algunas realizaciones, los cristales de anticuerpos anti-huIL-23p19 pueden difractar los rayos X a una resolución de al menos aproximadamente 5 \AA .

65 En diversas realizaciones, los cristales de anticuerpos anti-huIL-23, tales como cristales de anticuerpos anti-huIL-23p19, de la presente invención se pueden obtener mediante métodos de cristalización discontinua, métodos de difusión de vapor, métodos de difusión líquido-líquido y diálisis.

En otros aspectos, la invención se refiere a suspensiones de los anticuerpos cristalinos anti-huLL-23, tales como anticuerpos antihumanos IL-23p19, de la presente invención, en los que el anticuerpo está en una concentración de al menos 150 mg/ml. En una realización, la suspensión tiene una viscosidad de menos de la mitad de la de una formulación de solución correspondiente.

Los cristales de anticuerpos anti-huLL-23, tales como cristales de anticuerpos anti-huLL-23p19, de la presente invención tienen un incremento de estabilidad, es decir, mantienen la actividad biológica del anticuerpo anti-huLL-23, tal como anticuerpo anti-huLL-23p19, más largo que las formulaciones en solución correspondientes. En algunas realizaciones, la estabilidad aumentada es a temperatura ambiente, lo que permite el almacenamiento de las suspensiones cristalinas de la presente invención a temperatura ambiente en lugar de a 4°C, como la temperatura ambiente (por ejemplo, 20°C-25°C).

En una realización preferida, el anticuerpo anti-huLL-23p19 cristalino comprende

a) un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende los residuos 1 - 108 de la SEQ ID NO: 4; y

b) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende los residuos 1 - 116 de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3.

En un refinamiento preferido de la realización anterior, el anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la presente invención comprende:

a) un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende los residuos 1 -108 de la SEQ ID NO: 4; y

b) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende los residuos 1 - 116 de la SEQ ID NO: 2.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-huLL-23p19 cristalino comprende el dominio variable de la cadena ligera (residuos 1-108) de la SEQ ID NO: 4 y un dominio variable de la cadena pesada (residuos 1-116) de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1-3. En un refinamiento preferido de la realización anterior, la cadena ligera de anticuerpo consiste de la secuencia SEQ ID NO: 4; y la cadena pesada de anticuerpo consiste de la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-huLL-23p19 cristalino comprende una cadena pesada que comprende una región constante de cadena pesada humana γ 1 o una región constante de cadena pesada humana γ 4.

En diversas realizaciones, la invención se refiere al uso de las formulaciones cristalinas de la presente invención en el tratamiento de trastornos que incluyen, entre otros, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, trastornos proliferativos, tal como psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide (RA), enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), como la enfermedad de Crohn (CD) y colitis ulcerosa (UC), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), esclerosis múltiple (MS), uveítis, lupus eritematoso sistémico (SLE) y diabetes (IDDM). La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la presente invención en combinación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la reivindicación 1, dicho método comprende:

a) mezclar una solución de anticuerpo antihumano IL-23p19 y una solución precipitante para obtener una solución de cristalización, dicha solución de cristalización comprende:

a) un anticuerpo antihumano IL-23p19;

b) un tampón (pH 4.0 – 8.0);

c) 5 - 70% (v/v) 1,2 propanodiol; y

d) PEG 300 o 400;

b) incubar esa solución de cristalización durante un período de tiempo suficiente para la formación de cristales; y

c) recoger los cristales de la solución de cristalización.

En algunas realizaciones, se agrega un volumen igual de solución precipitante para formar la solución de cristalización.

En algunas realizaciones, la solución precipitante comprende un tampón con un pH entre 4 y 8, tal como 4.5, 5.5, 7.5, o cualquier otro valor adecuado. En varias realizaciones, los tampones son citrato de sodio, acetato de sodio, HEPES o BisTris.

5 En algunas realizaciones, la solución precipitante comprende 5-70% de 1,2 propanodiol, tal como 10%, 20%, 30% o cualquier otro valor adecuado. En realizaciones relacionadas, la solución de cristalización comprende 2.5-35% de 1,2 propanodiol, tal como 5%, 10%, 15% o cualquier otro valor adecuado.

10 En algunas realizaciones, la solución precipitante comprende 5-70% de PEG 300, tal como 14%, 40%, 70% o cualquier otro valor adecuado. En realizaciones relacionadas, la solución de cristalización comprende 2.5-35% de PEG 400, tal como 7%, 20%, 35% o cualquier otro valor adecuado. En otras realizaciones, la solución precipitante comprende 5-70% de PEG 400, tal como 20%, 25%, 27%, 30% o cualquier otro valor adecuado. En realizaciones relacionadas, la solución de cristalización comprende 2.5-35% de PEG 300, tal como 10%, 12.5%, 13.5%, 15% o cualquier otro valor adecuado.

15 En una realización, la solución precipitante comprende 1,2 propanodiol; HEPES (pH 7.5); y PEG 400, por ejemplo, 30% de 1,2 propanodiol; HEPES 0.1 M (pH 7.5); y 20% PEG 400. En una realización relacionada, la solución de cristalización puede comprender, por ejemplo, 15% de 1,2 propanodiol; HEPES 0.05 M (pH 7.5); y 10% de PEG 400.

20 En otra realización, la solución precipitante comprende PEG 300; acetato de sodio (pH 4.5); y NaCl, por ejemplo, 70% PEG 300; acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5); y NaCl 0.2 M. En una realización relacionada, la solución de cristalización puede comprender, por ejemplo, 35% de PEG 300; acetato de sodio 0.05 M (pH 4.5); y 0.1 M NaCl.

25 En algunas realizaciones, la solución de anticuerpos (es decir, la solución que se mezcla con la solución de precipitación para crear la solución de cristalización) comprende el anticuerpo antihumano IL-23 (por ejemplo, antihumano IL-23p19), citrato de sodio (pH 4-6), 4-10% de sacarosa, 0.1-0.5% de polisorbato 80. En una realización, la solución de anticuerpo comprende aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo anti-IL-23 humano (por ejemplo, anti-IL-23p19 humano), aproximadamente 10 mM de citrato de sodio (aproximadamente pH 4.8), aproximadamente 7% de sacarosa y aproximadamente 0.25% polisorbato 80.

30 En otra realización, la solución precipitante comprende PEG 300 o PEG 400 y citrato de sodio (pH 4-6), por ejemplo, 57.4% PEG 300 y citrato de sodio 0.1 M (pH 5.1). En una realización relacionada, la solución de cristalización puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 28.7% de PEG 300; 0.055 M citrato de sodio (pH 4.8-5.1). En esta realización, la solución de cristalización también comprende aproximadamente 50 mg/ml de anticuerpo, aproximadamente 3.5% de sacarosa y aproximadamente 0.125% de polisorbato 80.

35 En una realización, la solución de cristalización comprende:

40 a) un anticuerpo antihumano IL-23p19;

b) un tampón (pH 4.0 – 6.0);

c) 2 - 5% (peso/v) de sacarosa;

45 c) polisorbato 80 al 0.1 - 0.5% (v/v); y

d) PEG 300 o 400.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo antihumano IL-23 (o antihumano IL-23p19) está presente a 5-70 mg/ml en la solución de anticuerpo, por ejemplo, alrededor de 60 mg/ml. En una realización relacionada, el anticuerpo antihumano IL-23p19 está presente a 2.5-35 mg/ml en la solución de cristalización. En otras realizaciones, el anticuerpo antihumano IL-23 (o antihumano IL-23p19) está presente a aproximadamente 100 mg/ml en la solución de anticuerpo. En una realización relacionada, el anticuerpo antihumano IL-23p19 está presente a aproximadamente 50 mg/ml en la solución de cristalización.

55 En algunas realizaciones, la incubación se realiza entre 10 y 40°C, por ejemplo, a temperatura ambiente (por ejemplo, 22°C), durante 18 horas, 1 día, 5 días o 10 días, o cualquier otro tiempo suficiente para permitir la formación de cristales. En otras realizaciones, la temperatura se incrementa durante la etapa de incubación, por ejemplo, desde 4°C hasta 10-40°C. En otras realizaciones, la incubación se realiza a aproximadamente 30°C durante 24 horas, opcionalmente con agitación, como en una plataforma giratoria o nutator.

60 Breve descripción de los dibujos

65 La figura 1 es una fotomicrografía de cristales dentro de una suspensión cristalina de mAb anti-huIL-23p19, obtenida por difusión de vapor. El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b se cristalizó a partir de una solución que comprende 30% de

1,2 propanodiol, HEPES 0.1 M (pH 7.5) y PEG 400 al 20%. La fotomicrografía, con un aumento de 70x, se tomó después de 10 días a 18°C. Vea el Ejemplo 2.

5 La figura 2 es una fotomicrografía de cristales dentro de una suspensión cristalina de mAb anti-huIL-23p19, obtenida por difusión de vapor. El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b se cristalizó en una solución que comprende acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5), NaCl 0.2 M y PEG 300 al 40%. La fotomicrografía, con un aumento de 70x, se tomó después de 10 días a 18°C. Vea el Ejemplo 2.

10 La figura 3 es una fotomicrografía de cristales dentro de una suspensión cristalina de mAb anti-huIL-23p19, obtenida por difusión de vapor. El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b se cristalizó a partir de una solución que comprende 30% de 1,2 propanodiol, HEPES 0.1 M (pH 7.5) y PEG 400 al 20%. La fotomicrografía, con un aumento de 70x, se tomó después de 10 días a 4°C, y luego dos días a 22°C. Véase el Ejemplo 2.

15 La figura 4 es una fotomicrografía de cristales dentro de una suspensión cristalina de mAb anti-huIL-23p19, obtenida por difusión de vapor. El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b se cristalizó en una solución que comprende acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5), NaCl 0.2 M y PEG 300 al 40%. La fotomicrografía, con un aumento de 70x, se tomó después de 10 días a 4°C, y luego dos días a 22°C. Véase el Ejemplo 2.

20 La figura 5 es una fotomicrografía de cristales dentro de una suspensión cristalina de mAb anti-huIL-23p19, obtenida por cristalización discontinua a pH 7.5. El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b se cristalizó después de la mezcla con una solución que comprende 30% de 1,2 propanodiol, HEPES 0.1 M (pH 7.5) y PEG 400 al 20%, tal como se describe en el Ejemplo 3. La fotomicrografía, con un aumento de 70x, se tomó después de 18 horas a 22°C. El tamaño de las partículas varía de aproximadamente 3-5 micras.

25 La figura 6 es una fotomicrografía de cristales dentro de una suspensión cristalina de mAb anti-huIL-23p19, obtenida por cristalización discontinua a pH 4.5, como se discutió en el Ejemplo 3. El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b se cristalizó después de la mezcla con una solución que comprende PEG 300 al 58%, acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5) y NaCl 0.2 M. La fotomicrografía, a 400 aumentos, se tomó después de 18 horas a 22°C. Los tamaños de partículas varían de aproximadamente 30 a 80 micras.

30 La figura 7 es una fotomicrografía de cristales dentro de una suspensión cristalina de mAb anti-huIL-23p19, obtenida mediante diálisis en masa a pH 7.5, como se discutió en el Ejemplo 4. El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b se cristalizó después de la diálisis contra una solución que comprende 10% de 1,2 propanodiol, HEPES 0.1 M (pH 7.5) y PEG 400 al 20%. La fotomicrografía, a 400 aumentos, se tomó después de 18 horas a 22°C. Los tamaños de las partículas varían de aproximadamente 5-10 micras.

35 La figura 8 es una fotomicrografía de cristales dentro de una suspensión cristalina de mAb anti-huIL-23p19, obtenida por diálisis en masa a pH 4.5, como se discutió en el Ejemplo 4. El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b se cristalizó después de la diálisis contra una solución que comprende 14% de PEG 300; Acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5); y NaCl 0.2 M. La fotomicrografía, a 400 aumentos, se tomó después de 18 horas a 22°C. Los tamaños de las partículas varían de aproximadamente 5-10 micras.

40 La figura 9 es una fotomicrografía (con un aumento de 170X) de cristales dentro de una suspensión cristalina de mAb anti-huIL-23p19, obtenida por cristalización discontinua como se discutió en el Ejemplo 4 (último párrafo).

45 La figura 10 presenta una fotografía de un gel de SDS-PAGE que compara la solución mAb anti-huIL-23p19 13B8-b con el mismo material después de que se haya disuelto nuevamente del mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino de la presente invención. Los detalles se proporcionan en el Ejemplo 6, y como se indica en la Leyenda. El carril 1 está marcado con MW, y los carriles 2, 5, 8 y 11 están vacíos. Los carriles 3 y 4 se cargaron con 10 y 20 µg de solución de anticuerpo, respectivamente. Los carriles 6 y 7 se cargaron con 20 y 10 µg de anticuerpo cristalino redisolto, respectivamente. Los carriles 9 y 10 se cargaron con 20 y 10 µg de los licores madres aspirados de la suspensión cristalina, y el carril 12 se cargó con una porción del lavado.

50 Las figuras 11A y 11B presentan fotografías de cristales obtenidos por métodos de siembra, como se describe en el Ejemplo 8. Los cristales se obtuvieron mezclando volúmenes iguales de mAb anti-huIL-23p19 13B8-b en citrato de sodio 10 mM (pH 5.5) con un volumen igual de PEG 400 al 27%, citrato de sodio 0.1 M (pH 4.83), NaCl 0.2 M a 22°C. Las muestras se incubaron cinco días a 22°C y luego se rayaron con una punta de pipeta. Las fotografías se tomaron 24 horas después del rayado (FIG. 11A), y nuevamente a los 10 días después del rayado (FIG. 11B). Las figuras 11A y 11B tienen un aumento de 70X y 200X, respectivamente.

55 Descripción detallada

60 Tal como se usa en el presente documento, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras como "un", "una" y "la", incluyen sus correspondientes referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La Tabla 5 a continuación proporciona una lista de los identificadores de secuencia utilizados en esta solicitud. Todas las referencias aquí citadas se incorporan por referencia en la misma medida que si cada

publicación individual, solicitud de patente o patente estuviera específicamente e individualmente indicada para ser incorporada por referencia. La cita de las referencias en este documento no pretende ser una admisión de que cualquiera de los anteriores es una técnica anterior pertinente, ni constituye una admisión en cuanto al contenido o la fecha de estas publicaciones o documentos.

5

I. Definiciones

“Administración” y “tratamiento”, como se aplica a un animal, humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere al contacto de un agente farmacéutico, terapéutico, de diagnóstico o composición exógena con el animal, humano, sujeto, célula, tejido, órgano, o fluido biológico. “Administración” y “tratamiento” pueden referirse, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación y experimentales. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un líquido, donde el líquido está en contacto con la célula. “Administración” y “tratamiento” también incluyen tratamientos in vitro y ex vivo, por ejemplo, de una célula, por un reactivo, diagnóstico, composición de unión o por otra célula.

15

Como se usa en este documento, el término “región hipervariable” se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, residuos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de cadena ligera y residuos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de la cadena pesada (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada (Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Como se usa en el presente documento, el término “marco” o “FR” se refiere a aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable definidos aquí como residuos de CDR. La numeración de residuos anterior se relaciona con el sistema de numeración de Kabat y no necesariamente se corresponde en detalle con la numeración de secuencias en el Listado de secuencias adjunto.

20

25

Las “variantes modificadas de manera conservativa” o “sustitución conservativa” se refieren a las sustituciones de aminoácidos que son conocidas por los expertos en esta técnica y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante, incluso en regiones esenciales del polipéptido. Tales sustituciones ejemplares se realizan preferiblemente de acuerdo con las expuestas en la Tabla 1 de la siguiente manera:

30

Tabla 1

Sustituciones de aminoácidos conservadoras a modo de ejemplo	
Residuo original	Sustitución conservadora
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr

Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Además, los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica. Véase, por ejemplo, Watson et al. (1987) *Biología Molecular del Gen*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4ª edición).

La frase “consiste esencialmente en”, o las variaciones tales como “consisten esencialmente en” o “consisten esencialmente en”, como se usa a lo largo de la especificación y las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier elemento citado o grupo de elementos, y la inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a los elementos citados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del régimen de dosificación, el método o la composición especificados. Como ejemplo no limitativo, un compuesto de unión que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos citada también puede incluir uno o más aminoácidos, incluidas las sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos, que no afectan materialmente las propiedades del compuesto de unión.

La “afección inmunitaria” o “trastorno inmunitario” abarca, por ejemplo, la inflamación patológica, un trastorno inflamatorio y un trastorno o enfermedad autoinmunitaria, “afección inmunitaria” también se refiere a infecciones, infecciones persistentes y afecciones proliferativas, como cáncer, tumores y angiogénesis, incluidas infecciones, tumores y cánceres que resisten la erradicación del sistema inmunitario. “Afección neoplásica” incluye, por ejemplo, cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis y condiciones precancerosas como la displasia.

“Trastorno inflamatorio” significa un trastorno o afección patológica donde la patología resulta, en todo o en parte, de, por ejemplo, un cambio en el número, un cambio en la tasa de migración o un cambio en la activación de las células del sistema inmunitario. Las células del sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, células T, células B, monocitos o macrófagos, células presentadoras de antígenos (APC), células dendríticas, microglia, células NK, células NKT, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos o cualquier otra célula específicamente asociada con la inmunología, por ejemplo, células epiteliales o endoteliales productoras de citoquinas.

Tal como se usa en el presente documento, “inhibir” o “tratar” o “tratamiento” incluye un aplazamiento del desarrollo de los síntomas asociados con la enfermedad autoinmunitaria o la inmunopatología inducida por patógenos y/o una reducción en la gravedad de los síntomas que se desarrollarán o se espera se desarrollen. Los términos incluyen, además, mejorar los síntomas inmunopatológicos no controlados o no deseados existentes inducidos por autoinmunidad o inducidos por patógenos, prevenir síntomas adicionales y mejorar o prevenir las causas subyacentes de dichos síntomas. Por lo tanto, los términos abarcan, pero no se limitan a, circunstancias en las que se ha conferido un resultado beneficioso a un sujeto vertebrado con una enfermedad o síntoma inmunopatológico autoinmune o inducida por patógenos, o con el potencial de desarrollar tal enfermedad o síntoma.

Como se usa en este documento, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de un anticuerpo específico de IL-23p19 que cuando se administra solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a una célula, tejido o sujeto es efectivo para prevenir o mejorar la enfermedad autoinmunitaria o la enfermedad o afección asociada con inmunopatología inducida por patógenos o la progresión de la enfermedad. Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad del compuesto suficiente para mejorar los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o mejora de la afección médica relevante, o un aumento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de tales condiciones Cuando se aplica a un ingrediente activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya sea administrado en combinación, en serie o simultáneamente. Una cantidad efectiva de compuesto terapéutico disminuirá los síntomas, por lo general, en al menos un 10%; por lo general en al menos 20%; preferiblemente al menos aproximadamente el 30%; más preferiblemente al menos el 40%, y lo más preferiblemente al menos el 50%. Véase, por ejemplo, Maynard et al. (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK.

Para examinar el grado de inhibición de la actividad de IL-23, por ejemplo, las muestras o los ensayos que comprenden una proteína, gen, célula u organismo dado, se tratan con un agente inhibidor potencial, como un mAAb anti-huIL-23p19, y se comparan con muestras de control sin el agente. A las muestras de control, es decir, no tratadas con agente, se les asigna un valor de actividad relativa del 100%. La inhibición se logra cuando el valor de la actividad en relación con el control es aproximadamente 90% o menos, típicamente 85% o menos, más típicamente 80% o menos, lo más típicamente 75% o menos, generalmente 70% o menos, más generalmente 65% o menos, más generalmente 60% o menos, típicamente 55% o menos, generalmente 50% o menos, más generalmente 45% o menos, más generalmente 40% o menos, preferiblemente 35% o menos, más preferiblemente 30% o menos, aún más preferiblemente 25% o menos, y lo más preferiblemente menos de 25%. La activación se logra cuando el valor de la actividad en relación con el control es aproximadamente 110%, generalmente al menos 120%, más generalmente al menos 140%, más generalmente al menos 160%, a menudo al menos 180%, más a menudo al menos 2 veces, lo más a menudo al menos 2.5 veces, normalmente al menos 5 veces, más usualmente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 40 veces, y lo más preferiblemente más de 40 veces más.

Los enlaces “específicamente” o “selectivamente”, cuando se refieren a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno u otro par de enlace, indican una reacción de enlace que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, bajo condiciones designadas, un ligando específico se une a un receptor particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. Como se usa en este documento, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia dada (en este caso IL-23p19) si se une a polipéptidos que comprenden la secuencia de IL-23p19 pero no se une a proteínas que carecen de la secuencia de IL-23p19. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende IL-23p19 puede unirse a una forma etiquetada con FLAG® de IL-23p19 pero no se unirá a otras proteínas etiquetadas con FLAG®.

“Interleucina-23” (o “IL-23”) significa una proteína que consta de dos subunidades polipeptídicas, p19 y p40. La secuencia de la subunidad p19 humana (también conocida como IL-23p19, IL-23A) se proporciona en el Número de Acceso de la Base de Datos de Secuencias de Proteínas NCBI NP-057668. La secuencia de la subunidad p40 humana (también conocida como IL-12p40, IL-12B) se proporciona en el Número de Acceso de la Base de Datos de Secuencias de Proteínas NCBI NP-002178.

Como se usa en este documento, “antihumano IL-23p19” y “anti-huIL-23p19” se refieren a anticuerpos que se unen específicamente a la subunidad p19 de la interleucina humana (IL-23). A menos que se indique lo contrario, o que quede claro en el contexto, “IL-23” e “IL-23p19” se refieren a sus respectivas formas humanas. A menos que se indique lo contrario, o claro del contexto, los anticuerpos a los que se hace referencia en este documento son anticuerpos monoclonales.

Como se usa en este documento, se puede usar una “solución de anticuerpo” para referirse a una solución de un anticuerpo anti-huIL-23p19 que se usa para generar el anticuerpo cristalino de la presente invención. “Solución precipitante” se refiere a una segunda solución que se mezcla con la solución de anticuerpos, generalmente en una proporción de 1:1 (es decir, se mezclan volúmenes iguales de las dos soluciones) para crear una “solución de cristalización” a partir de la cual crecen los anticuerpos. Las concentraciones del anticuerpo y las soluciones precipitantes se proporcionan aquí para una mezcla 1:1, por conveniencia, pero un experto en la técnica reconocerá que la relación de volumen utilizada para hacer la mezcla se puede cambiar, y por lo tanto las concentraciones de las soluciones que componen la mezcla. Dichas modificaciones están dentro del alcance de la invención si generan las mismas condiciones de cristalización (es decir, la misma solución de cristalización) que las mezclas descritas en este documento.

Como se usa en este documento, y con respecto a los métodos de cristalización basados en diálisis, “solución de diálisis” se refiere a la solución contra la cual se dializa una solución de anticuerpo anti-huIL-23p19 (la “solución de anticuerpo”) para conducir la formación del anticuerpo cristalino de la presente invención. “Retenido” se refiere a la solución de anticuerpo después de la diálisis, que puede incluir cristales del anticuerpo, que se recolectan. La solución de anticuerpo/retenido está en un lado de la membrana de diálisis, y la solución de diálisis está en el lado opuesto.

Un “precipitante” es un compuesto que disminuye la solubilidad de un polipéptido, como un anticuerpo, en una solución concentrada. En los métodos de cristalización por lotes, el precipitante se incluye en la “solución precipitante” y en los métodos de diálisis en masa, el precipitante se incluye en la “solución para diálisis”. Los precipitantes inducen la cristalización formando una capa empobrecida en precipitante energéticamente desfavorable alrededor de las moléculas polipeptídicas. Para minimizar la cantidad relativa de esta capa de agotamiento, los polipéptidos forman asociaciones y, en última instancia, cristales. Este proceso se explica en Weber (1991) *Advances in Protein Chemistry* 41:1, que se incorpora como referencia. Se conocen diversos precipitantes en la técnica e incluyen: sulfato de amonio, etanol, isopropanol, 1,2 propanodiol, 3-etil-2,4 pentanodiol; y muchos de los poliglicoles, como el polietilenglicol (por ejemplo, PEG 300 y PEG 400). Además de los precipitantes, a veces se agregan otros materiales a la solución precipitante del polipéptido. Estos incluyen tampones, como Tris o HEPES, para ajustar el pH de la solución (y, por lo tanto, la carga superficial en el péptido) y sales, tales como cloruro de sodio, cloruro de litio y citrato de sodio, para reducir la solubilidad del polipéptido.

5 Cuando se usa con referencia a una suspensión de anticuerpos cristalinos de la presente invención, "concentración" se refiere a la cantidad de anticuerpo (en este caso, anticuerpo anti-huLL-23p19) presente en una unidad macroscópica dada de volumen de solución. El término concentración se usa en su sentido habitual a pesar de la heterogeneidad inherente de la suspensión, en comparación con una solución tradicional. La concentración de anticuerpo en una suspensión cristalina es igual a la concentración de una muestra equivalente en la que el anticuerpo no estaba en forma cristalina.

II. General

10 La presente invención proporciona formas cristalinas de anticuerpos anti-huLL-23p19, suspensiones de estos cristales y formulaciones farmacéuticas de estas suspensiones. El anticuerpo monoclonal anti-interleuquina-23p19 humano purificado hu13B8-b se utilizó en experimentos de matriz dispersa de difusión de vapor de alto rendimiento (HT). Las suspensiones cristalinas se obtuvieron a temperatura ambiente utilizando PEG de bajo peso molecular (300 y 400) y 1,2 propanodiol, o bajo otras condiciones como se divulga en el presente documento. Se establecieron condiciones para preparar suspensiones cristalinas por métodos de cristalización en masa (lote y diálisis) con alto rendimiento. Las suspensiones cristalinas resultantes tienen un tamaño de partícula de 5-200 micras. El anticuerpo obtenido al volver a disolver los cristales se ha caracterizado por ELISA, SDS PAGE y dispersión dinámica de la luz. Las propiedades del anticuerpo cristalino redissuelto son similares a las de la muestra de partida del anticuerpo original en todos los estudios de caracterización biofísica.

20 Los anticuerpos cristalinos anti-huLL-23p19 de la presente invención tienen varias propiedades ventajosas para uso en terapia. Las suspensiones cristalinas de anticuerpos anti-huLL-23p19 de la presente invención también pueden prepararse a concentraciones más altas que las formulaciones en solución. Esta alta concentración puede permitir una administración más eficiente al sujeto, por ejemplo, por inyección subcutánea. Por ejemplo, las formulaciones de solución a 100 mg/ml no se pueden usar para administrar más de 100 mg a un sujeto con una sola inyección subcutánea debido a las limitaciones de cuánto volumen puede administrarse prácticamente en un solo sitio de inyección. Esto limita la dosis a aproximadamente 1.5 mg/kg, a menos que el sujeto esté dispuesto a aceptar (y en algunos casos administrar) inyecciones múltiples en múltiples sitios. Las suspensiones cristalinas de la presente invención, por el contrario, pueden usarse para preparar formulaciones farmacéuticas de hasta 200 mg/ml o más, lo que permite una mayor dosificación con un menor volumen de inyección y, por lo tanto, menos molestias. Las suspensiones cristalinas de la presente también tienen una viscosidad significativamente menor que las formulaciones en solución de alta concentración, lo que facilita la administración con jeringa y/o permite el uso de una aguja más pequeña para inyección. Las suspensiones cristalinas de la presente invención pueden administrarse mediante inyección subcutánea utilizando agujas de pequeño calibre, tales como jeringas de insulina 28G. Es probable que el volumen reducido, la viscosidad reducida y el uso de una aguja más pequeña disminuyan las molestias para el paciente que acompañan la administración subcutánea de anticuerpos anti-huLL-23p19, lo que es especialmente preocupante cuando un fármaco está destinado a la autoadministración (por ejemplo, con una jeringa precargada o autoinyector).

40 Las suspensiones cristalinas de anticuerpos anti-huLL-23p19 de la presente invención también exhiben propiedades superiores con respecto a la farmacocinética de la administración de fármacos. En comparación con las formulaciones en solución correspondientes, las suspensiones cristalinas de la presente invención exhiben una biodisponibilidad retardada. Este suministro del fármaco (anticuerpo anti-huLL-23p19) liberado en el tiempo a la circulación en el sujeto puede aumentar ventajosamente el tiempo durante el cual el fármaco está presente en una dosis efectiva para una administración dada. Esto puede reducir el pico inicial en la concentración de fármaco que de lo contrario se produciría poco después de la administración (por ejemplo, administración subcutánea de una formulación de solución) y puede permitir una dosificación menos frecuente.

50 Los anticuerpos anti-huLL-23p19 cristalinos de la presente invención también tienen otras propiedades ventajosas. Las suspensiones de los anticuerpos anti-huLL-23p19 cristalinos probablemente tendrán una estabilidad mejorada en comparación con las formulaciones en solución correspondientes, es decir, las suspensiones cristalinas conservarán la actividad biológica anti-IL-23 durante un tiempo más prolongado. Las suspensiones de los anticuerpos anti-huLL-23p19 cristalinos de la presente invención pueden almacenarse incluso a temperatura ambiente, mientras que las formulaciones en solución típicas deberían almacenarse a 4°C. La vida útil más larga y la capacidad de almacenar las suspensiones de la presente invención, a temperatura ambiente, ofrece ventajas significativas en el manejo del producto farmacéutico y la gestión de la cadena de suministro.

60 Los anticuerpos anti-huLL-23p19 cristalinos redissueltos de la presente invención se caracterizan en el Ejemplo 6. Estos resultados demuestran que los anticuerpos cristalinos redissueltos de la presente invención retienen la afinidad de unión y la actividad biológica (neutralización de IL-23) del material de partida y, por lo tanto, que son adecuados para todos los fines para los cuales fue adecuado el anticuerpo original, por ejemplo. Tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Específicamente, los anticuerpos anti-huLL-23p19 cristalinos redissueltos de la presente invención son sustancialmente similares a los evaluados por SDS-PAGE, y la dispersión dinámica de la luz muestra que el anticuerpo redissuelto permanece monodisperso con aproximadamente el mismo peso molecular observado experimentalmente. Vea la Tabla 3, Ejemplo 6. Los anticuerpos anti-huLL-23p19 cristalinos redissueltos de la presente invención también exhiben valores de EC50 sustancialmente similares cuando se comparan con el material de partida en un ELISA. Vea la Tabla 4, Ejemplo 6.

Por consiguiente, los anticuerpos anti-huLL-23p19 cristalinos que retienen las propiedades del material de partida de precristalización dentro de tolerancias aceptables se incluyen en realizaciones de la presente invención. Las tolerancias aceptables para los diversos parámetros funcionales pueden variar según el uso previsto, pero con respecto a la afinidad de unión o la actividad biológica, puede incluir una retención del 100%, 90%, 75%, 50% o 25% del afinidad o actividad original (no cristalizado). Por ejemplo, los valores K_D o EC50/IC50 aceptables pueden incluir 1, 2, 3, 4 o 5X los valores K_D o EC50/IC50 originales (no cristalizados), ya que estos valores numéricos aumentados corresponden a una afinidad de unión y actividad biológica disminuidas. Los métodos para determinar la afinidad de unión y la actividad biológica (neutralizadora) se encuentran en los Ejemplos 9-12.

Los propios cristales de anticuerpos anti-huLL-23p19 se caracterizan en el Ejemplo 7. La difracción de rayos X demuestra que los cristales de anticuerpos anti-huLL-23p19 se caracterizan por dimensiones celulares unitarias de $a = 192 \text{ \AA}$, $b = 192 \text{ \AA}$, $c = 106 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ y están en el grupo 14 de espacio. Los cristales de anticuerpos anti-huLL-23p19 que exhiben propiedades sustancialmente similares también están incluidos en las realizaciones de la presente invención.

La invención proporciona además diversos métodos para preparar el anticuerpo anti-huLL-23p19 cristalino de la presente invención, como se describe con mayor detalle en los Ejemplos 2-4. El Ejemplo 2 proporciona métodos basados en la difusión de vapor, que son los más adecuados para el cribado para determinar las condiciones de cristalización preferidas, en lugar de la producción de cristales a gran escala. Dichos métodos también pueden ser adecuados para la generación de cristales grandes para uso en estudios de difracción de rayos X, por ejemplo, para determinar la estructura tridimensional del anticuerpo anti-huLL-23p19.

Con respecto a la producción a escala comercial de anti-huLL-23p19 cristalino, por ejemplo, para uso terapéutico, los ejemplos 3 y 4 proporcionan protocolos de cristalización más adecuados para la producción a gran escala, como la cristalización discontinua y la cristalización en diálisis en masa. Se proporcionan dos conjuntos independientes de condiciones de solución para cada ejemplo, uno a pH 7.5 y el otro a pH 4.5. Los métodos descritos en los Ejemplos 3 y 4 susceptibles de ser ampliados para la producción a escala comercial. El Ejemplo 5 proporciona un método de recolección de cristales de la presente invención usando centrifugación, pero los métodos de filtración conocidos en la técnica, tales como la filtración por flujo tangencial de fibra hueca, también se pueden usar para recoger cristales, por ejemplo, a escala comercial. Aunque las realizaciones descritas específicas emplean una mezcla 1:1 de una solución de anticuerpo con una solución precipitante, cualquier modificación del método que termine con aproximadamente las mismas concentraciones de componentes de la solución en la solución de cristalización final (de la cual surgen los cristales) sería equivalente. Específicamente, las concentraciones de los componentes en la solución precipitante pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente si la solución precipitante comprende menos del 50% o más del volumen final de la solución de cristalización, respectivamente.

Los métodos de cristalización de la presente invención también proporcionan un método para purificar anticuerpos anti-huLL-23p19, incluso si dichos cristales se vuelven a disolver antes de su uso. En una realización, se produce un anticuerpo anti-huLL-23p19 y, al menos parcialmente, se purifica mediante métodos descritos en otra parte en este documento (Sección VII) y conocido en la técnica. El anticuerpo se cristaliza entonces, por ejemplo, por cristalización discontinua como se describe en el Ejemplo 3, o por diálisis en masa como se describe en el Ejemplo 4. El anticuerpo cristalino se recuperó y se lavó, por ejemplo, cómo se describe en el Ejemplo 5 (o por filtración), y se redisuelve esencialmente como se describe en el primer párrafo del Ejemplo 6, excepto que el tampón de resuspensión no necesita ser citrato de sodio 10 mM (pH 5.5), sino que puede ser cualquier tampón adecuado para el uso previsto del anticuerpo purificado. Para usos terapéuticos, se usarían tampones y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados.

III. Cristalización de proteínas

Se conocen varios métodos de cristalización. Giege et al. (1994) Acta Crystallogr. D50:339; McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189:1. Tales técnicas incluyen la difusión de vapor de gota colgante (McPherson (1976) J. Biol. Chem. 251: 6300), difusión de vapor de gotas sentadas, microbatch y diálisis. Tanto la difusión de la gota colgante como la del vapor de la gota sentada implican una gota que contiene una proteína purificada, un tampón y un precipitante que se deja equilibrar con un reservorio más grande que contiene tampones y precipitantes similares en concentraciones más altas. Inicialmente, la gota de solución proteica contiene una concentración insuficiente de precipitante para la cristalización, pero a medida que el agua se evapora de la gota y se transfiere al depósito, la concentración del precipitante aumenta a un nivel óptimo para la cristalización. Dado que el sistema está en equilibrio, estas condiciones óptimas se mantienen hasta que se completa la cristalización. El método de gota colgante difiere del método de gota sentada en la orientación vertical de la gota de solución de proteína dentro del sistema. En el método de microbatch, el polipéptido se mezcla con precipitantes para lograr la sobresaturación, y el recipiente se sella y se aparta hasta que aparecen los cristales. En el método de diálisis, el polipéptido se retiene en un lado de una membrana de diálisis que se pone en contacto con una solución que contiene precipitante. El equilibrio a través de la membrana aumenta la concentración del precipitante, lo que hace que el polipéptido alcance niveles de sobresaturación. Para los métodos de la presente invención, es deseable usar un anticuerpo anti-huLL-23p19 a una concentración de proteína inicial de aproximadamente 5-100 mg/ml, tal como 60 mg/ml o 100 mg/ml.

Las suspensiones cristalinas uniformes de proteínas terapéuticas presentan oportunidades para nuevos sistemas de administración de fármacos. Las suspensiones de insulina cristalina se han utilizado como preparaciones de liberación sostenida durante más de cincuenta años (Brange et al. (1999) Adv. Drogas Deliv. Rdo. 35:307). También se han propuesto suspensiones cristalinas para el suministro de interferón (Patente de Estados Unidos No. 5.972.331) y anticuerpos monoclonales (Yang et al. (2003) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 100: 6934). Las formas cristalinas también permiten sistemas de administración no inyectables, como la administración pulmonar para la administración local o sistémica de proteínas terapéuticas (Patente de Estados Unidos No. 5.972.331).

Henry Bence Jones fue el primero en describir los cristales naturales de las cadenas ligeras de inmunoglobulina, la llamada "proteína de Bence-Jones", aisló la orina de un paciente con mieloma. Jones (1848) Phil. Trans. Royal Soc. (Londres) 55-62. Sin embargo, los anticuerpos intactos de longitud completa son difíciles de cristalizar, probablemente debido a la flexibilidad de sus múltiples (cuatro) cadenas polipeptídicas. Si bien, ha habido numerosos informes de cristalización de anticuerpos intactos en los últimos 30 años, solo cuatro estructuras se han depositado en el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Databank (RCSB-PDB). En contraste, se han depositado más de 800 estructuras para los fragmentos de anticuerpos, como los fragmentos Fab (apo o complejados).

Algunos anticuerpos terapéuticos de longitud completa han sido cristalizados. La determinación de la estructura cristalina para un anticuerpo anti-IL-13 humano se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2005/121177 (publicada como Patente de Estados Unidos No. 7,615,213) de Wyeth, y los procedimientos para la preparación de cristales de TNF- α antihumanos cristalinos se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2008/057240 (publicada como Patente de Estados Unidos No. 8.034.906) para Abbott Biotechnology, Ltd. Los métodos para la preparación de anticuerpos anti-IL-12 humanos se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2008/121301 (publicada como Patente de Estados Unidos No. 8,168,760) para Abbott Laboratories.

Los cristales de proteínas, incluidos los anticuerpos, también se están desarrollando como composiciones terapéuticas. Altus Pharmaceuticals, ahora parte de Althea Technologies, Inc., ha puesto tres formulaciones de proteínas cristalinas en ensayos clínicos en humanos: ALTU-238 (formulación inyectable de acción prolongada de somatropina); ALTU-237 (enzima que degrada el oxalato oral); y ALTU-236 (enzima degradante de fenilalanina oral). Los investigadores de Altus también cristalizaron tres anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente (rituximab, trastuzumab e infliximab) mediante métodos de difusión de vapor o cristalización discontinua. Yang et al. (2003) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 100: 6934; Publicación de Solicitud de Patente Internacional. WO 02/072636, publicada como la patente de EE.UU. No. 7,833,525). Los cristales de alta viscosidad y alta concentración resultantes se obtuvieron con un alto rendimiento y mostraron una excelente estabilidad física y química, así como la retención de la actividad biológica in vitro. La inyección subcutánea de suspensiones cristalinas de trastuzumab e infliximab dio lugar a un perfil farmacocinético sérico extendido y una alta biodisponibilidad en comparación con las formas solubles de los anticuerpos administrados por vía intravenosa. La formulación cristalina de trastuzumab también fue eficaz en un modelo preclínico de cáncer de mama humano. Las partículas de proteínas esféricas de anticuerpos terapéuticos se divulga en la patente de EE.UU. No. 7,998,477.

La cristalización por los métodos de la presente invención también proporciona un método mejorado de purificación de anticuerpos anti-huIL-23p19. Aunque la cristalización a gran escala se usa con frecuencia en la purificación de pequeñas moléculas orgánicas, hay pocos ejemplos del uso de la cristalización en la preparación de proteínas. Una excepción es el uso de un paso de cristalización en la fabricación de interferón alfa-2b (IFN- α_{2b}), donde se usa un método de inducción de temperatura en el proceso de purificación en una escala de multigramas. La suspensión cristalina resultante se recoge por centrifugación, se lava y se solubiliza en un tampón de fosfato salino normal frío. El proceso de cristalización y recolección elimina las moléculas pequeñas, impurezas relacionadas con interferón y no interferón que pueden permanecer en el licor o lavado madre. La cristalización también confirma la pureza de la proteína terapéutica.

IV. Biología IL-23

La interleuquina-23 (IL-23) es una citoquina heterodimérica compuesta por dos subunidades, p19 que es exclusiva de IL-23, y p40, que se comparte con IL-12. La subunidad p19 está relacionada estructuralmente con la IL-6, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y la subunidad p35 de la IL-12. IL-23 media la señalización mediante la unión a un receptor heterodimérico, compuesto por IL-23R e IL-12 β 1, que es compartido por el receptor de IL-12. Una serie de estudios iniciales demostraron que las consecuencias de una deficiencia genética en p40 (ratón modificado p40KO; ratón p40KO) fueron más graves que las encontradas en un ratón p35KO. Algunos de estos resultados fueron finalmente explicados por el descubrimiento de IL-23, y el hallazgo de que el p40KO evita la expresión no solo de IL-12, sino también de IL-23 (ver, por ejemplo, Oppmann et al. (2000) Inmunidad 13: 715-725; Wiekowski et al. (2001) J. Immunol. 166:7563-7570; Parham et al. (2002) J. Immunol. 168:5699-708; Frucht (2002) Sci STKE 2002, E1-E3; Elkins et al. (2002) Infección inmunidad 70: 1936-1948). Se puede encontrar información adicional relacionada con IL-23 (IL23A) en la base de datos de genes del NCBI bajo GeneID 51561, y en la base de datos en línea de Herencia Mendeliana en el Hombre bajo MIM 605580, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia.

Estudios recientes, a través del uso de ratones p40 KO, han demostrado que el bloqueo tanto de IL-23 como de IL-12 es un tratamiento eficaz para varios trastornos inflamatorios y autoinmunitarios. Se sabe que la IL-23 desempeña un papel central en la psoriasis, y el anticuerpo antagonista de la IL-23/IL-12 ustekinumab (mAb anti-IL-12/23p40) ha sido aprobado en los EE. UU. y Europa para el tratamiento de la psoriasis. Sin embargo, el bloqueo de IL-12 a p40 parece tener varias consecuencias sistémicas, como una mayor susceptibilidad a infecciones microbianas oportunistas. Bowman et al. (2006) Curr. Opin. Infectar. Dis. 19:245.

V. Anticuerpo anti-huIL-23 - 13B8-b

La presente solicitud divulga datos relacionados con la cristalización del clon de anticuerpo anti-IL-23p19 humano 13B8-b, como se describe y reivindica en el documento WO 2008/103432 comúnmente asignado, cuya descripción se incorpora aquí como referencia en su totalidad. El documento WO 2008/103432 divulga un anticuerpo anti-huIL-23p19 humanizado, denominado 13B8-a, y dos variantes que difieren solo en los residuos en CDRH2, designados 13B8-b y 13B8-c. Las secuencias de CDRH2 se proporcionan en la Tabla 2. La secuencia 13B8 de la cadena ligera humanizada (con región constante kappa) se proporciona en la SEQ ID NO: 4, y el dominio variable de la cadena ligera comprende los residuos 1-108 de esa secuencia. Se proporcionan tres versiones de la secuencia 13B8 de la cadena pesada humanizada (con regiones constantes de γ 1) en las SEQ ID NO: 1-3, y el dominio variable de la cadena pesada comprende los residuos 1-116 de esas secuencias.

Tabla 2

Variantes de Anticuerpo 13B8 CDRH2		
Anticuerpo	Secuencia CDRH2	SEQ ID NO:
13B8-a	QIFPASGSADYNEMFEG	6
13B8-b	QIFPASGSADYNEKFEG	7
13B8-c	QIFPASGSADY AQKLQG	8

Un hibridoma que expresaba el anticuerpo parental (ratón) 13B8 se depositó de conformidad con el Tratado de Budapest con la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC-Manassas, Virginia, EE. UU.) El 17 de agosto de 2006 con el Número de Acceso PTA-7803. Todas las restricciones sobre la accesibilidad de este depósito se eliminarán irrevocablemente al otorgar una patente de los Estados Unidos basada en la presente solicitud.

VI. Anticuerpos antihumanos IL-23 adicionales

La naturaleza heterodimérica de IL-23 sugiere que los anticuerpos antagonistas pueden unirse exclusivamente a la subunidad p40, exclusivamente a la subunidad p19, o exclusivamente al complejo IL-23 (p40 y p19). Se han reportado anticuerpos antagonistas de IL-23 en las tres categorías. Aunque los resultados presentados en este documento se obtuvieron exclusivamente con el clon 13B8-b del anticuerpo antihumano IL-23p19 humanizado, es posible que los métodos usados en este documento también puedan usarse para cristalizar estos otros anticuerpos antagonistas anti-IL-23. En algunas de estas realizaciones proféticas, el anticuerpo antagonista de IL-23 se une a la subunidad p40 de IL-23 e IL-12. Los ejemplos incluyen ustekinumab (CNTO 1275) y briakinumab (ABT-874, J-695). Centocor comercializa el Ustekinumab para el tratamiento de la psoriasis, y se describe en la Patente de EE. UU. No. 6,902,734 y la patente de EE.UU. No. 7,166,285 (otorgado a Centocor, Inc.), cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Específicamente, las secuencias de SEQ ID NO: 7 (dominio variable de cadena pesada) y 8 (dominio variable de cadena ligera), de la patente de EE.UU. 6,902,734 se incorporan aquí como referencia. SEQ ID NO: 4-5-6 y 1-2-3 de la Patente de EE. UU. No. 6,902,734 también se incorporan como referencia. Briakinumab fue desarrollado por Abbott y se describe en la patente de EE. UU. No. 6,914,128 y la patente de EE.UU. No. 7,504,485, cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Las secuencias para ustekinumab también se proporcionan en las SEQ ID NO: 16-25 de la lista de secuencias de la presente solicitud. Específicamente, las secuencias de SEQ ID NO: 31 (dominio variable de cadena pesada), 32 (dominio variable de cadena ligera) SEQ ID NOs; 30-28-26 (CDR de cadena ligera 1-2-3, respectivamente) y 29-27-25 (CDR de cadena pesada 1-2-3, respectivamente) de la patente de EE.UU. 6,914,128 se incorporan aquí como referencia. Las secuencias para briakinumab también se proporcionan en las SEQ ID NO: 26-35 de la lista de secuencias de la presente solicitud. Los ejemplos también incluyen un anticuerpo que se une específicamente a IL-23p40 pero no a IL-12p40 como se describe en la patente de EE.UU. No. 7,247,711 (otorgada a Centocor).

En otras realizaciones proféticas, el anticuerpo antagonista de IL-23 se une a la subunidad p19 de IL-23. Los ejemplos incluyen LY2525623 de Eli Lilly y CNTO 1959 de Centocor, ambos de los cuales han ingresado en ensayos clínicos en humanos. Específicamente, las secuencias de las SEQ ID NO: 48 y 52 (dominios variables de cadena pesada), 57 (dominio variable de cadena ligera), 28-37-40 (CDR de cadena ligera 1-2-3, respectivamente) y 3-8-19 (CDR de

cadena ligera 1-2-3, respectivamente) del documento EP 1937721 B1 (para Eli Lilly and Company) se incorporan aquí como referencia. Además, las secuencias de SEQ ID NO: 106 (dominio variable de cadena pesada), 116 (dominio variable de cadena ligera), 50-56-73 (CDR de cadena ligera 1-2-3, respectivamente) y 5-20-44 (CDR de cadena ligera 1-2-3, respectivamente) de la patente de EE.UU. No. 7,935,344 (otorgado a Centocor) también se incorporan aquí como referencia. Otros ejemplos incluyen el anticuerpo monoclonal FM303 (Femta Pharmaceuticals) y los anticuerpos descritos en los documentos WO 2008/103432, US 2007/0048315 y WO 2008/103473 (para Schering Corp.); Patente de EE.UU. No. 7,491,391, Patente de EE.UU. No. 7,935,344 y EP 1971366 A2 (otorgada a Centocor Ortho Biotech, Inc.); Patente de EE.UU. No. 7,872,102 (otorgado a Eli Lilly and Co.); WO 2007/147019, WO 2008/134659 y WO 2009/082624 (otorgado a Zymogenetics); US 2009/0311253 (otorgado a Abbott Bioresearch); y US 2009/0123479 y WO 2010/115786 (otorgado a Glaxo SmithKline), cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

En otras realizaciones proféticas adicionales, el anticuerpo antagonista de IL-23 se une al complejo de IL-23 en lugar de a las subunidades individuales. Los ejemplos incluyen un anticuerpo que hace contactos con las subunidades p19 y p40 de IL-23 (WO 2011/056600 a Amgen, Inc.) y un anticuerpo que se une a IL-23 pero no significativamente a ninguna de sus subunidades individuales (documento WO 2012/009760 otorgado a Cephalon Australia Pty., Ltd).

Otros ejemplos de anticuerpos antagonistas no específicos de IL-23 que se unen a la subunidad p40 de IL-23 e IL-12 se divulgan en Clarke et al. (2010) mAb 2: 1-11 (Cephalon Australia, Pty., Ltd.). FM202 (Femta Pharmaceuticals) también es un anticuerpo monoclonal que se une a la subunidad p40 de IL-12 e IL-23, como lo son los anticuerpos divulgados en el documento WO 2010/017598 (Arana Therapeutics, Ltd.).

VII. Producción de anticuerpos

En una realización, para la producción recombinante de los anticuerpos de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican las dos cadenas se aíslan y se insertan en uno o más vectores replicables para la clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. En una realización, tanto las cadenas ligeras como pesadas del anticuerpo anti-huIL-23p19 humanizado de la presente invención se expresan a partir del mismo vector, por ejemplo, un plásmido o un vector adenoviral.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, los anticuerpos se expresan en células de mamíferos o insectos en cultivo, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células 293 de riñón embrionario humano (HEK), células NSO de mieloma de ratón, células de riñón de hámster (BHK) de bebé, células ováricas *Spodoptera frugiperda* (Sf9). En una realización, los anticuerpos secretados a partir de células CHO se recuperan y purifican mediante métodos cromatográficos estándar, tales como proteína A, intercambio catiónico, intercambio aniónico, interacción hidrófoba y cromatografía de hidroxipatita. Los anticuerpos resultantes se concentran y almacenan en acetato de sodio 20 mM (pH 5.5).

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención se producen en levadura de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 2005/040395. Brevemente, los vectores que codifican las cadenas ligeras o pesadas individuales de un anticuerpo de interés se introducen en diferentes células haploides de levadura, por ejemplo, diferentes tipos de acoplamiento de la levadura *Pichia pastoris*, cuyas células haploides de levadura son auxótrofos opcionalmente complementarios. Las células de levadura haploides transformadas se pueden acoplar o fusionar para obtener una célula de levadura diploide capaz de producir tanto las cadenas pesadas como las ligeras. La cepa diploide es capaz de secretar el anticuerpo completamente ensamblado y biológicamente activo. Los niveles de expresión relativos de las dos cadenas pueden optimizarse, por ejemplo, utilizando vectores con diferente número de copias, usando promotores transcripcionales de diferentes resistencia, o induciendo la expresión de promotores inducibles que conducen la transcripción de los genes que codifican una o ambas cadenas.

En una realización, las respectivas cadenas pesadas y ligeras de una pluralidad de diferentes anticuerpos anti-IL-23p19 (los anticuerpos "originales") se introducen en células haploides de levadura para crear una biblioteca de cepas de levadura haploides de un tipo de apareamiento que expresan una pluralidad de cadenas ligeras, y una biblioteca de cepas de levadura haploides de un tipo de acoplamiento diferente que expresa una pluralidad de cadenas pesadas. Estas bibliotecas de cepas haploides se pueden acoplar (o fusionar como esferoplastos) para producir una serie de células de levadura diploides que expresan una biblioteca combinatoria de anticuerpos que comprende las diversas permutaciones posibles de las cadenas ligeras y pesadas. La biblioteca combinatoria de anticuerpos se puede analizar para determinar si alguno de los anticuerpos tiene propiedades superiores (por ejemplo, una afinidad más alta por la IL-23) a las de los anticuerpos originales. Ver, por ejemplo, WO 2005/040395.

VIII. Composiciones farmacéuticas

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles, los anticuerpos cristalinos antihumano IL-23p19 de la presente invención se mezclan con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania (1984).

5 La selección de un régimen de administración para un tratamiento terapéutico depende de varios factores, entre ellos, la tasa de recambio de suero o tejido de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. Preferiblemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente de acuerdo con un nivel aceptable de efectos secundarios.

10 En consecuencia, la cantidad de agente biológico administrado depende en parte de la entidad en particular y de la gravedad de la afección que se está tratando. Se dispone de orientación para seleccionar las dosis adecuadas de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas. Véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602.

20 El médico realiza la determinación de la dosis apropiada, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos o sospechosos en la técnica para afectar el tratamiento o predecir que afectará el tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se incrementa en pequeños incrementos a partir de ese momento hasta que se logre el efecto deseado o óptimo en relación con los efectos secundarios negativos. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de los síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citoquinas inflamatorias producidas.

30 Las composiciones de anticuerpos cristalinos de la presente invención se pueden proporcionar por infusión continua o por dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, 1-7 veces por semana, una semana, dos semanas, mensual, bimestral, trimestral, bianual, anual, etc. Las dosis se pueden administrar por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, intracerebral, intraespinal o por inhalación. Un protocolo de dosis preferido es uno que involucra la dosis máxima o la frecuencia de la dosis que evita los efectos secundarios significativos no deseados. Una dosis semanal total generalmente es de al menos 0.05 µg/kg, 0.2 µg/kg, 0.5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0.2 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg de peso corporal o más. Véase, por ejemplo, Yang et al. (2003) *Nueva Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold et al. (2002) *Nueva Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu et al. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psicoanalizar.* 67:451-456; Portielji et al. (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144.

40 Las formulaciones cristalinas de anticuerpos anti-huIL-23p19 de la presente invención pueden permitir la administración a niveles que de otra manera no son prácticos usando formulaciones en solución estándar, tales como la administración a concentraciones de 100, 15, 200, 250 mg/ml o más altas. Tal entrega de alta concentración permite la administración de dosis altas por inyección subcutánea, en la que existe un límite práctico de aproximadamente 1 ml para el volumen que se puede administrar en cualquier inyección dada. Las formulaciones cristalinas de anticuerpos anti-huIL-23p19 de la presente invención también pueden permitir modos de administración que de otra manera no son prácticos, tales como administración oral, pulmonar o sin agujas.

45 IX. Usos

La presente invención proporciona métodos para usar anticuerpos anti-huIL-23 diseñados y sus fragmentos para el tratamiento de trastornos y afecciones inflamatorias, por ejemplo, del sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y tracto gastrointestinal, así como trastornos autoinmunitarios y proliferativos.

50 Se proporcionan métodos para el tratamiento de, por ejemplo, esclerosis múltiple (EM), incluida EM recurrente-remitente y EM primaria progresiva, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (a.k.a. ALS; Enfermedad de Lou Gehrig), lesión cerebral isquémica, enfermedades priónicas y demencia asociada al VIH. También se proporcionan métodos para tratar el dolor neuropático, las neuropatías postraumáticas, el síndrome de Guillain-Barré (SGB), la polineuropatía periférica y la regeneración nerviosa.

60 Se proporcionan métodos para tratar o mejorar una o más de las siguientes características, síntomas, aspectos, manifestaciones o signos de esclerosis múltiple u otro trastorno o afección inflamatoria del sistema nervioso: lesiones cerebrales, lesiones de mielina, desmielinización, placas desmielinizadas, alteración visual, pérdida de equilibrio o coordinación, espasticidad, alteraciones sensoriales, incontinencia, dolor, debilidad, fatiga, parálisis, deterioro cognitivo, bradifrenia, diplopía, neuritis óptica, parestesia, ataxia de la marcha, fatiga, síntoma de Uhthoff, neuralgia, afasia, apraxia, convulsiones, pérdida del campo visual, demencia, fenómenos extrapiramidales, depresión, sensación de bienestar u otros síntomas emocionales, mielopatía crónica progresiva y un síntoma detectado por imágenes de resonancia magnética (IRM), incluidas las lesiones que mejoran el gadolinio, registros posibles evocados, o examen del líquido cefalorraquídeo. Véase, por ejemplo, Kenealy et al. (2003) *J. Neuroimmunol.* 143:7-12; Noseworthy et al.

(2000) *New Engl. J. Med.* 343:938-952; Miller et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:15-23; Chang et al. (2002) *New Engl. J. Med.* 346:165-173; Bruck and Stadelmann (2003) *Neurol. Sci.* 24 Suppl. 5:S265-S267

Además, la presente invención proporciona métodos para tratar trastornos inflamatorios del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca y síndrome del intestino irritable. Se proporcionan métodos para tratar o mejorar uno o más de los siguientes síntomas, aspectos, manifestaciones o signos de un trastorno inflamatorio del intestino: malabsorción de alimentos, alteración de la motilidad intestinal, infección, fiebre, dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal, pérdida de peso, signos de malnutrición, enfermedad perianal, masa abdominal y retraso del crecimiento, así como complicaciones intestinales como estenosis, fístulas, megacolon tóxico, perforación y cáncer, incluidos hallazgos endoscópicos, como friabilidad, úlceras aftosas y lineales, aspecto de adoquines, pseudopolipos, y afectación rectal y, además, anticuerpos anti-levadura. Véase, por ejemplo, Podolsky, supra; Hanauer, supra; Horwitz y Fisher, supra.

También se contempla el tratamiento de trastornos inflamatorios como la psoriasis, la dermatitis atópica, la artritis, incluida la artritis reumatoide, la osteoartritis y la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, la enfermedad de injerto contra huésped, los trastornos autoinmunitarios, como el lupus eritematoso sistémico y la diabetes tipo I, y trastornos proliferativos como el cáncer. Véase, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente PCT WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; y el documento WO 01/18051. También se contempla el tratamiento de infecciones crónicas, tales como infecciones fúngicas crónicas, por ejemplo, Infecciones por *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. Ver las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales comúnmente cedidas WO 2008/153610.

Los compuestos de unión a IL-23p19 de la presente invención también pueden usarse en combinación con uno o más antagonistas de otras citoquinas (por ejemplo, anticuerpos), que incluyen, entre otros, IL-17A, IL-17F, IL-1 β , IL-6 y TGF- β . Véase, por ejemplo, Veldhoen (2006) *Immunity* 24: 179-189; Dong (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6(4): 329-333. En diversas realizaciones, un compuesto de unión a IL-23p19 de la invención se administra antes, simultáneamente con, o después de la administración de otro antagonista o antagonistas, tal como un anticuerpo anti-IL-17A. En una realización, se usa un compuesto de unión a IL-17A en el tratamiento de la fase temprana aguda de una respuesta inmunitaria adversa (por ejemplo, MS, Enfermedad de Crohn) sola o en combinación con un anticuerpo antagonista de IL-23 de la presente invención. En este último caso, el compuesto de unión a IL-17A puede disminuir gradualmente y el tratamiento con el antagonista de IL-23 solo se continúa para mantener la supresión de la respuesta adversa. Alternativamente, los antagonistas de IL-1 β , IL-6 y/o TGF- β pueden administrarse simultáneamente, antes o después de un compuesto de unión a IL-23p19 de la presente invención. Ver Cua y Kastelein (2006) *Nat. Immunol.* 7: 557-559; Publicaciones de Solicitudes de Patentes Internacionales comúnmente cedidas WO 2008/106131; Tato y O'Shea (2006) *Nature* 441: 166-168; Iwakura e Ishigame (2006) *J. Clin. Invest.* 116:1218-1222.

El amplio alcance de esta invención se entiende mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar las invenciones a las realizaciones específicas. Las realizaciones específicas descritas en el presente documento se ofrecen solo a modo de ejemplo, y la invención debe estar limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los que tienen derecho dichas reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Métodos generales

Se describen métodos estándar en biología molecular. Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant ADN*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA. Los métodos estándar también aparecen en Ausbel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, que describe la clonación en células bacterianas y mutagénesis de ADN (Vol. 1), clonación en células de mamíferos y levaduras (Vol. 2), glicoconjugados y expresión de proteínas (Vol. 3) y bioinformática (Vol. 4).

Se describen métodos para la purificación de proteínas que incluyen inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización. Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York. Se describen el análisis químico, la modificación química, la modificación postraduccional, la producción de proteínas de fusión, la glicosilación de proteínas. Véase, por ejemplo, Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391. Se describe la producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY;

Harlow and Lane, *supra*. Se dispone de técnicas estándar para caracterizar las interacciones ligando/receptor. Véase, por ejemplo, Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York.

Ejemplo 2

Cristalización por difusión de vapor de mAb Anti-huLL-23p19 13B8-b

Las condiciones para preparar cristales de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b se determinaron de la siguiente manera. Se preparó una solución de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b a 61.9 mg/ml en citrato de sodio 10 mM (pH 5.5). La solución se seleccionó en experimentos de difusión de vapor de gota colgante utilizando pantallas disponibles comercialmente de Emerald BioStructures (Bainbridge Island, Washington, EE. UU.), Qiagen Technologies (Gaithersburg, Maryland, EE. UU.) y Jena Bioscience (Jena, DE.) En placas de cristalización Neuro Probe, Inc. (Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). La solución de anticuerpo (0.5 μ l) se mezcló con una solución de reserva complementaria (0.5 μ l) y se suspendió sobre 80 μ l de solución de reserva complementaria. Los experimentos se realizaron a 4°C y 18°C y se monitorizaron microscópicamente a lo largo del tiempo. Se observaron cristales en experimentos a 18°C después de 10 días en el sistema de cribado Qiagen utilizando una primera solución de depósito complementaria que comprende 30% de 1,2 propanodiol; HEPES 0.1 M (pH 7.5); y 20% de PEG 400, y también utilizando una segunda solución complementaria de depósito que comprende acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5); 40% de PEG 300; y NaCl 0.2 M. Las fotomicrografías de los cristales resultantes se proporcionan en las Figs. 1 y 2, respectivamente.

Dos experimentos análogos a 4°C no mostraron evidencia de cristales después de 10 días, pero ambos experimentos produjeron cristales dentro de los dos días posteriores a que la temperatura se cambió a 22°C (temperatura ambiente). Las fotomicrografías de los cristales observados en los experimentos a 4°C se proporcionan en las Figs. 3 y 4.

Experimentos adicionales no lograron generar ningún cristal. No se observaron cristales bajo ninguna afección en los sistemas Emerald BioStructures o Jena Bioscience. Tampoco se observaron cristales, ni a 4°C ni a 18°C, bajo cuatro condiciones: PP(PEG/sal); HPPEG (PEG/sal); J1 (PEG/sal); J2 (sal).

Ejemplo 3

Cristalización discontinua de anti-huLL-23p19 mAb 13B8-b

A la luz de los resultados obtenidos en el Ejemplo 2, la cristalización discontinua de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b a pH 7.5 se realizó de la siguiente manera. Se preparó una solución de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b a 60 mg/ml en citrato de sodio 10 mM (pH 5.5). Se mezclaron 500 μ l de esta solución con un volumen igual de 30% de 1,2 propanodiol; HEPES 0.1 M (pH 7.5); y PEG 400 al 20% a 4°C. La mezcla se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente (22°C). Se proporciona una fotomicrografía de los cristales resultantes en la FIG. 5. La suspensión cristalina se recuperó como se describe en el Ejemplo 5 con un rendimiento del 85%.

La cristalización por lotes de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b también se realizó a pH 4.5, como sigue. Se preparó una solución de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b a 60 mg/ml en citrato de sodio 10 mM (pH 5.5). Se mezclaron 500 μ l de esta solución con un volumen igual de PEG 300 al 70%; acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5); y NaCl 0.2 M a 4°C. La mezcla se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente (22°C). Se proporciona una fotomicrografía de los cristales resultantes en la FIG. 6. La suspensión cristalina se recuperó como se describe en el Ejemplo 5 con un rendimiento del 70%.

Alternativamente, la cristalización por lotes de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b se realizó de la siguiente manera. Se preparó una solución de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b a 100 mg/ml en citrato de sodio 10 mM (pH 4.8), 7% de sacarosa, 0.25% de polisorbato 80. Se mezclaron 500 μ l de esta solución con un volumen igual de citrato de sodio 100 mM (pH 5.1), 57.4% de PEG 300 a 22°C. La mezcla se colocó en un mezclador nutator ClayAdams (BD Diagnostics Part No. 421105) (VWR International LLC, Radnor, Penna., EE. UU.) y se incubó 24 horas a 30°C. En la figura 9 se proporciona una fotomicrografía de los cristales resultantes. La suspensión cristalina se recuperó como se describe en el Ejemplo 5 con un rendimiento del 90%.

Ejemplo 4

Cristalización en diálisis en volumen de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b

La cristalización en diálisis en volumen de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b a pH 7.5 se realizó de la siguiente manera. Se preparó una solución de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b a 60 mg/ml en citrato de sodio 10 mM (pH 5.5) y se dializó en una membrana DispoDialyzer® (corte de 8K MW) (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Domínguez, California, EE. UU.) contra 10 ml de 10% de 1,2 propanodiol; HEPES 0.1 M (pH 7.5); y 20% de PEG 400 durante 18 horas a temperatura ambiente (22°C). Se proporciona una fotomicrografía de los cristales resultantes en la FIG. 7. La suspensión cristalina se recuperó como se describe en el Ejemplo 5 con un rendimiento del 50%.

La cristalización en diálisis en volumen de mAb anti-huIL-23p19 13B8-b también se realizó a pH 4.5, como sigue. Se preparó una solución de mAb anti-huIL-23p19 13B8-b a 60 mg/ml en citrato de sodio 10 mM (pH 5.5) y se dializó en una membrana DispoDialyzer® (corte de 8K MW) contra 10 ml de PEG 300 al 14%; Acetato de sodio 0.1 M (pH 4.5); y NaCl 0.2 M durante 18 horas a temperatura ambiente (22°C). Se proporciona una fotomicrografía de los cristales resultantes en la FIG. 8. La suspensión cristalina se recuperó como se describe en el Ejemplo 5 con un rendimiento del 33%.

Ejemplo 5

10 Recolección de suspensiones cristalinas por centrifugación.

El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino se recolecta de las suspensiones de cristal de la siguiente manera. La suspensión se centrifuga en una microcentrífuga Fisher a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El licor madre se elimina por aspiración y el sedimento se resuspende en solución estabilizadora (citrato de sodio 100 mM, pH 4.8, PEG 400 al 25%, NaCl 200 mM, metilparabeno al 0.1%).

La suspensión cristalina se centrifuga de nuevo durante 5 minutos a 5.000 rpm, el sobrenadante (lavado) se elimina por aspiración y el sedimento se resuspende en solución estabilizadora. Este paso de lavado se repite dos veces más. El sedimento resultante se resuspende en solución estabilizante estéril y se almacena a temperatura ambiente.

20 Ejemplo 6

Caracterización de mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino

25 El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino rediseñado se caracterizó por SDS PAGE, dispersión de luz dinámica (DLS) y ELISA, como sigue.

Una suspensión de mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino se centrifugó en una microcentrífuga Fisher a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El licor madre se eliminó por aspiración y el sedimento se resuspendió en solución estabilizadora (citrato de sodio 100 mM, pH 4.8, PEG 400 al 25%, NaCl 200 mM, metilparabeno al 0.1%). La suspensión se centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 5.000 rpm, el sobrenadante (lavado) se eliminó por aspiración y el sedimento se resuspendió en citrato de sodio 10 mM (pH 5.5). La solución resultante se clarificó por centrifugación y la solución cristalina rediseñada se usó para los estudios de caracterización.

35 El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino rediseñado se comparó con el anticuerpo de solución original reduciendo la SDS-PAGE, como se ilustra en la fotografía de gel de la FIG. 10. Como se usa en el presente documento, la "solución" de mAb anti-huIL-23p19 13B8-b se refiere al mismo anticuerpo que en la forma cristalina de la invención (y de hecho es su material de partida), pero nunca se ha cristalizado. El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino rediseñado, cargado en los carriles 6 y 7 (20 y 10 µg, respectivamente), tiene el mismo aspecto que la solución original del anticuerpo, cargado en los carriles 3 y 4 (10 y 20 µg, respectivamente).

45 El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino rediseñado también se comparó con el anticuerpo de solución original mediante dispersión dinámica de la luz. DLS puede proporcionar información sobre la distribución de especies en solución, incluido el número de especies que se pueden resolver, su tamaño y el nivel de homogeneidad de una sola medición. Se usó un instrumento de dispersión de luz DynaPro (Wyatt Technologies, Santa Barbara, California, EE. UU.) Para medir el estado de agregación de mAb anti-huIL-23p19 13B8-b en solución. El peso molecular derivado experimentalmente para la solución de cristal rediseñado se juzgó como monodisperso, y comparable al material de partida de mAb anti-IL-23p19. Ver tabla 3.

50 Tabla 3

Anti-Hu-IL 23 mAB 13B8-b	PM Teórico (K _D a)	PM Experimental (K _D a)	Índice de Polydispersión	Predicción
Solución	150	90	16	Monodisperso
Cristales Rediseñados	150	45	15	Monodisperso

55 El mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino rediseñado también se comparó con el anticuerpo de solución original mediante ELISA. Se analizaron dos lotes diferentes de cada solución y mAb anti-huIL-23p19 13B8-b cristalino rediseñado para determinar su capacidad para unirse a IL-23. La IL-23 humana se inmovilizó en una placa ELISA, y se agregaron a los pozos diluciones en serie de mAb anti-huIL-23p19 13B8-b (solución o cristalina rediseñada). Después de lavar las placas, se detectó el anticuerpo unido utilizando un anticuerpo anti-IgG marcado con HRP y un sustrato colorimétrico. Las placas se leyeron en un lector de placas y las curvas de respuesta a la dosis se analizaron mediante un ajuste logístico de cuatro parámetros. En el equilibrio, la EC₅₀ de una curva de unión de saturación refleja la

constante de disociación de unión al equilibrio (K_D), donde un valor más alto representa una afinidad más baja y un valor más bajo representa una afinidad más alta del anticuerpo para el ligando. La potencia de la muestra de prueba se evalúa comparando las curvas de unión de las muestras de prueba con un material de referencia por la relación de las EC50. La potencia se expresa como porcentaje del material de referencia, en este caso, seleccionado para ser el lote No. 1 de la forma de solución de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b. Los resultados, proporcionados en la Tabla 4, indican que el mAb anti-huLL-23p19 13B8-b cristalino rediseñado presenta una afinidad de unión comparable al material de la solución original.

Tabla 4

Muestra	EC50 (pM)	(desv. est.)	Potencia Relativa (% de Solución #1)
Solución #1	71	± 15	[100]
Solución #2	106	± 50	67
Cristales Rediseñados #1	73	± 10	97
Cristales Rediseñados #2	116	± 52	61

Ejemplo 7

Análisis de difracción de rayos X de cristales de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b

Los cristales de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b se caracterizaron por difracción de rayos X de la siguiente manera. Se cultivaron cristales a partir de una solución de 60 mg/ml de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b en citrato de sodio 10 mM (pH 5.5) agregando un volumen igual de PEG 400 al 20%, Li_2SO_4 200 mM, cacodilato 100 mM (pH 6.4) como la solución precipitante. La cristalización se configuró a 22°C utilizando una técnica de gota colgante. Los cristales se recogieron y se protegieron criogénicamente usando PEG 400 al 30%, Li_2SO_4 200 mM, cacodilato 100 mM (pH 6.4). Los datos de difracción de rayos X se recolectaron usando radiación de sincrotrón en ID-17 (Argonne National Laboratory, Argonne, Illinois, EE. UU.), y luego se procesaron y escalaron utilizando el paquete de software de cristalografía macromolecular HKL-2000 (HKL Research, Inc., Charlottesville, Va., EE. UU.). Se recopiló un conjunto de datos completo con una resolución máxima de 3.5 Å. Los cristales mAb anti-huLL-23p19 13B8-b pertenecen al sistema 14 con $a = b = 191.8$ Å, $c = 105.9$ Å (redondeando a $a = b = 192$ Å y $c = 106$ Å), y $\alpha = \beta = \gamma = 90$ grados.

Ejemplo 8

Uso de la siembra en la cristalización de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b

Los cristales de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b se prepararon usando un protocolo de siembra, como sigue. Se insertó un micro puente en cada pozo de una placa de cristalización VDX (Hampton Research, Aliso Viejo, California). EE. UU. En cada micro puente, se mezclaron 25 μl de una solución de 60 mg/ml de mAb anti-huLL-23p19 13B8-b en citrato de sodio 10 mM (pH 5.5) con un volumen igual de PEG 400 al 27%, citrato de sodio 0.1 M (pH 4.83), NaCl 0.2 M a 22°C. La mezcla se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente (22°C). Después de cinco días, cada experimento fue rayado con una punta de pipeta. En la Figura 11A se proporciona una fotomicrografía de una gota representativa después de rayar, y una fotomicrografía de la suspensión cristalina observada final antes de la recolección en la Figura 11B. La suspensión cristalina se recogió como se describe en el Ejemplo 5 con un rendimiento del 70%.

Ejemplo 9

Determinación de la constante de disociación de equilibrio (K_D) para mAb antihumano IL-23p19 utilizando la tecnología KinExA

Los experimentos para confirmar que el mAb anti-huLL-23p19 cristalino rediseñado de la presente invención retiene la afinidad de unión para la IL-23 humana se pueden realizar de la siguiente manera. La constante de disociación de equilibrio (K_D) para los anticuerpos IL-23p19 antihumanos cristalinos disueltos nuevamente, así como el mAb anti-huLL-23p19 en solución (el material de partida para producir el anticuerpo cristalino de la presente invención), se determina utilizando el instrumento KinExA 3000. Sapidyne Instruments Inc., Boise Idaho, EE. UU. KinExA utiliza el principio del Método de Ensayo de Exclusión Cinética basado en la medición de la concentración de anticuerpos no complejos en una mezcla de anticuerpo, antígeno y complejo antígeno-anticuerpo. La concentración de anticuerpo libre se mide exponiendo la mezcla a un antígeno inmovilizado en fase sólida durante un período de tiempo muy breve. En la práctica, esto se logra haciendo fluir la mezcla de antígeno-anticuerpo en fase de solución a través de partículas recubiertas con antígeno atrapadas en una celda de flujo. Los datos generados por el instrumento se analizan

utilizando un software personalizado. Las constantes de equilibrio se calculan utilizando una teoría matemática basada en los siguientes supuestos:

1. La unión sigue la ecuación de unión reversible para el equilibrio:

$$k_{on} [Ab] [Ag] = k_{off} [AbAg]$$

2. El anticuerpo y el antígeno se unen 1:1 y el anticuerpo total es igual al complejo antígeno-anticuerpo más el anticuerpo libre.

3. La señal del instrumento está relacionada linealmente con la concentración de anticuerpos libres.

Partículas de PMMA de 98 micras (Sapidyne, Cat. 440198) están recubiertas con IL-23 biotinilada de acuerdo con Sapidyne "Protocolo para el recubrimiento de partículas de PMMA con ligandos biotinilados que tienen brazos enlazadores cortos o inexistentes". En una realización del experimento, la IL-23 biotinilada comprende un complejo de IL-12p40 de ratón e IL-23p19 humana. EZ-link TFP PEO-biotina (Pierce, Cat. No. 21219) se utiliza para fabricar IL-23 biotinilada de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (boletín Pierce 0874). Todos los procedimientos experimentales se realizan de acuerdo con el manual de KinExA 3000.

La unión de los anticuerpos anti-huIL-23p19 cristalinos redisolutos se evalúa en un ensayo de unión competitiva, en el que los anticuerpos se incuban previamente con IL-23 humana no ligada (nativa) que comprende dos cadenas unidas por disulfuro, p19 humana (SEQ ID NO: 13) y p40 humano (número de acceso de GenBank P29460), en una serie de concentraciones. Las muestras resultantes, que comprenden una mezcla de anticuerpos no unidos y anticuerpos unidos a IL-23, luego fluyen sobre las partículas de PMMA rhIL-23 ("elastiquina") descritas en el párrafo anterior. La cantidad de anticuerpo capturado por las partículas de PMMA se detecta luego utilizando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia.

Los K_D resultantes para el material de partida y el anticuerpo cristalino redisoluto se comparan para determinar si el anticuerpo cristalino redisoluto retiene una afinidad de unión suficiente para la IL-23 humana.

Ejemplo 10

Determinación de la constante de disociación de equilibrio (K_D) para mAb antihumano IL-23p19 utilizando la tecnología BIAcore

Los experimentos adicionales para confirmar que el mAb anti-huIL-23p19 cristalino redisoluto de la presente invención retiene la afinidad de unión por la IL-23 humana se pueden realizar de la siguiente manera. La constante de disociación de equilibrio (K_D) para los anticuerpos IL-23 antihumanos cristalinos disueltos nuevamente, así como el mAb anti-huIL-23p19 en solución (el material de partida para producir el anticuerpo cristalino de la presente invención), se determina utilizando métodos de resonancia de plasmón de superficie (SPR), por ejemplo, Tecnología BIAcore. BIAcore Life Sciences, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, Penna., EE. UU. Las determinaciones de BIAcore se realizan esencialmente como se describe en el Ejemplo 4 de la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos comúnmente cedida No. 2007/0048315. Brevemente, los ligandos (mAb anti-huIL-23p19) se inmovilizan en un chip sensor BIAcore CM5 utilizando un procedimiento estándar de acoplamiento de amina. IL-23 se diluye en PBS para producir diversas concentraciones. Las constantes cinéticas para las diversas interacciones se determinan utilizando el software BIAevaluation 3.1. La K_D se determina utilizando las constantes de velocidad de asociación y disociación calculadas.

Los K_D resultantes para el material de partida y el anticuerpo cristalino redisoluto se comparan para determinar si el anticuerpo cristalino redisoluto retiene una afinidad de unión suficiente para la IL-23 humana.

Ejemplo 11

Bioensayos de proliferación para la evaluación de anticuerpos neutralizantes anti-huIL-23p19

Los experimentos para confirmar que el mAb anti-huIL-23p19 cristalino redisoluto de la presente invención retiene la capacidad de neutralizar la IL-23 humana se pueden realizar mediante la aplicación de bioensayos de proliferación a corto plazo que emplean células que expresan receptores de IL-23 recombinantes, como sigue. La línea celular transfectante IL-23R (Ba/F3-2.2lo-hIL-23R) expresa tanto hIL-23R como hIL-12R β 1, y responde tanto a IL-23 humana como a IL-23 de mono cynomolgus. Las células transfectantes Ba/F3-2.2lo proliferan en respuesta a la IL-23 humana y la respuesta puede inhibirse por un anticuerpo neutralizante anti-huIL-23p19. Se titula un anticuerpo contra una concentración de IL-23 elegida dentro de la región lineal de la curva de dosis-respuesta, cerca de la meseta y por encima de EC50. La proliferación, o la falta de ella, se mide por medios colorimétricos utilizando Alamar Blue, un colorante indicador de crecimiento basado en la detección de la actividad metabólica. La capacidad de un anticuerpo para neutralizar la IL-23 se evalúa por su valor de IC50, es decir, la concentración de anticuerpo que induce la inhibición media máxima de la proliferación de IL-23.

Los transfectantes Ba/F3 se mantienen en medio RPMI-1640, suero de ternera fetal al 10%, 2-mercaptoetanol 50 μ M, L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 50 μ g/ml y 10-g/ml de IL-3 de ratón. Los bioensayos de proliferación de Ba/F3 se realizan en medio RPMI-1640, suero de becerro fetal al 10%, 2-mercaptoetanol 50 μ M, L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina 50 μ g/ml.

Procedimiento

Los ensayos se realizan en placas de fondo plano de 96 pozos (Falcon 3072 o similar) en 150 μ l por pozo. Los anticuerpos anti-huIL-23p19 se incuban previamente con IL-23 durante 30-60 minutos, seguido de la adición de células y la incubación durante 40-48 horas. Se agrega Alamar Blue (Biosource Cat # DAL1100) y se deja desarrollar durante 5-12 horas. Luego se lee la absorbancia a 570 nm y 600 nm (VERSAmax Microplate Reader, Molecular Probes, Eugene, Oregón, EE. UU.), y se obtiene una $OD_{570-600}$.

Las células se utilizan en un estado de crecimiento saludable, generalmente a densidades de $3-8 \times 10^5$ /ml. Las células se cuentan, se sedimentan, se lavan dos veces en medio de bioensayo y se suspenden a la densidad apropiada para la siembra. Se realiza una respuesta a la dosis de IL-23 utilizando diluciones en serie 1:3 (25:50 μ l en medio de bioensayo) de IL-23 humana. Se selecciona una concentración de IL-23 de 3 ng/ml (50 pM) para uso en ensayos de anticuerpos. También se realiza una respuesta de dosis de anticuerpos neutralizantes utilizando diluciones en serie 1:3 (25:50 μ l en medio de bioensayo).

Los valores de IC50 se determinan utilizando el software GraphPad Prism® 3.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, California, EE. UU.), en el que se representa la absorbancia frente a la concentración de citoquinas o anticuerpos y los valores de IC50 se determinan mediante regresión no lineal (ajuste de curva) de dosis-respuesta sigmoideal.

Las IC50 resultantes para el material de partida y el anticuerpo cristalino redisuuelto se comparan para determinar si el anticuerpo cristalino redisuuelto conserva la capacidad de neutralizar la IL-23 humana a un nivel aceptable.

Ejemplo 12

Ensayo de esplenocitos de ratón para IL-23 basado en la producción de IL-17

La actividad biológica (capacidad de neutralización) de los anticuerpos anti-huIL-23p19 cristalinos disueltos nuevamente de la presente invención también se puede evaluar utilizando el ensayo de esplenocitos esencialmente como se describe en Aggarwal et al. (2003) J. Biol. Chem. 278: 1910 y Stumhofer et al. (2006) Naturaleza Immunol. 7:937. El ensayo de esplenocitos de ratón mide la actividad de la IL-23 humana en una muestra como un nivel de producción de IL-17 por esplenocitos murinos. La actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-huIL-23p19 se evalúa luego determinando la concentración de anticuerpo necesaria para reducir la actividad de IL-23 en una muestra dada en un 50% (la IC50). La IC50 medida por este ensayo es mayor o igual que la constante de unión a la disociación en equilibrio (K_D), es decir, la K_D puede ser igual o inferior a la IC50. Como siempre, los valores más bajos de IC50 y K_D reflejan actividades y afinidades más altas.

Brevemente, los bazos se obtienen de ratones hembra C57BL/6J de 8 a 12 semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, EE. UU.). Los bazos se muelen, se sedimentan dos veces y se filtran a través de un filtro de células (70 μ m de nailon). Las células recuperadas se cultivan en placas de 96 pozos (4×10^5 células/pozo) en presencia de IL-23 humana (10 ng/ml, ~ 170 pM) y anticuerpos anti-CD3e de ratón (1 μ g/ml). (BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, EE. UU.), con o sin el anticuerpo anti-huIL-23p19 que se analizará. Se añaden anticuerpos anti-huIL-23p19 (redisueltos a partir de cristales o de la solución) a 10 μ g/ml y a una serie de diluciones de 3 veces. Las células se cultivan durante 72 horas, se sedimentan y el sobrenadante se analiza para determinar los niveles de IL-17 mediante un ELISA tipo sándwich.

IL-17 ELISA se realiza de la siguiente manera. Las placas se recubren con un anticuerpo anti-IL-17 de captura (100 ng/pozo) durante la noche a 4°C, se lavan y se bloquean. Se añaden muestras y patrones y se incuban durante dos horas a temperatura ambiente con agitación. Se lavan las placas y se agrega un anticuerpo de detección anti-IL-17 biotinilado (100 ng/pozo) y se incuba durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Los anticuerpos de captura y detección son anticuerpos diferentes que se unen al IL-17 de ratón, pero no se bloquean de forma cruzada. Las placas se lavan y el anticuerpo de detección unido se detecta utilizando estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) y TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina). Luego se lee la placa a 450-650 nm y se calcula la concentración de IL-17 en las muestras por comparación con los estándares. Las IC50 se calculan a partir de los niveles de IL-17.

Las IC50 resultantes para el material de partida y el anticuerpo cristalino redisuuelto se comparan para determinar si el anticuerpo cristalino redisuuelto conserva la capacidad de neutralizar la IL-23 humana a un nivel aceptable.

La Tabla 5 proporciona una breve descripción de las secuencias en la lista de secuencias.

Tabla 5

Identificadores de Secuencia	
SEQ ID NO:	Descripción
1	13B8 HC-a
2	13B8 HC-b
3	13B8 HC-c
4	13B8 LC
5	13B8 CDRH1
6	13B8 CDRH2-a
7	13B8 CDRH2-b
8	13B8 CDRH2-c
9	13B8 CDRH3
10	13B8 CDRL1
11	13B8 CDRL2
12	13B8 CDRL3
13	human IL-23p 19
14	13B8-b HC ADN
15	13B8 LC ADN
16	ustekinumab CDRH1
17	ustekinumab CDRH2
18	ustekinumab CDRH3
19	ustekinumab CDRL1
20	ustekinumab CDRL2
21	ustekinumab CDRL3
22	ustekinumab V _H
23	ustekinumab V _L
24	ustekinumab HC
25	ustekinumab LC
26	briakinumab CDRH1
27	briakinumab CDRH2
28	briakinumab CDRH3
29	briakinumab CDRL1
30	briakinumab CDRL2
31	briakinumab CDRL3

ES 2 729 603 T3

32	briakinumab V _H
33	briakinumab V _L
34	briakinumab HC
35	briakinumab LC
36	guselkumab CDRH1
37	guselkumab CDRH2
38	guselkumab CDRH3
39	guselkumab CDRL1
40	guselkumab CDRL2
41	guselkumab CDRL3
42	guselkumab V _H
43	guselkumab V _L
44	guselkumab HC
45	guselkumab LC

Listado de secuencias

- 5 <110> MERCK SHARPE & DOHME CORP.
 Reichert, Paul
 Prorise, Winifred W.
 Orth, Peter
 Narasimhan, Chakravarthy Nachu
 Kashi, Ramesh S.
- 10 <120> Anticuerpos antihumanos IL-23 cristalinos
 <130> 23213
 <150> US 61/665,172
- 15 <151> 2012-06-27
 <160> 45
 <170> Patent In version 3.5
 <210> 1
 <211> 446
- 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Marcos humanos, CDR de roedor
 <220>
- 25 <221> DOMINIO
 <222> (1)..(116)
 <223> Dominio variable
 <400> 1

ES 2 729 603 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Met Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

ES 2 729 603 T3

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

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

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

ES 2 729 603 T3

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 2

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Marcos humanos, CDR de roedor

<220>

10 <221> DOMINIO

<222> (1)..(116)

<223> Dominio variable

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30

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

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

Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

15 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

ES 2 729 603 T3

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 3
 <211> 446
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Marcos humanos, CDR de roedor
 <220>
 10 <221> DOMINIO
 <222> (1)..(116)
 <223> Dominio variable
 <400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

15

ES 2 729 603 T3

Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

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

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

ES 2 729 603 T3

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 4
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Marcos humanos, CDR de roedor
 <220>
 10 <221> DOMINIO
 <222> (1)..(108)
 <223> Dominio variable
 <400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu 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 His His Tyr Gly Ile Pro Phe

15

ES 2 729 603 T3

Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln Cys Gln Gln
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His Pro Leu Val
 20 25 30

Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr Thr Asn Asp
 35 40 45

Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Arg
 50 55 60

Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Ile Phe
 65 70 75 80

Tyr Glu Lys Leu Leu Gly Ser Asp Ile Phe Thr Gly Glu Pro Ser Leu
 85 90 95

Leu Pro Asp Ser Pro Val Gly Gln Leu His Ala Ser Leu Leu Gly Leu
 100 105 110

Ser Gln Leu Leu Gln Pro Glu Gly His His Trp Glu Thr Gln Gln Ile
 115 120 125

Pro Ser Leu Ser Pro Ser Gln Pro Trp Gln Arg Leu Leu Leu Arg Phe
 130 135 140

Lys Ile Leu Arg Ser Leu Gln Ala Phe Val Ala Val Ala Ala Arg Val
 145 150 155 160

Phe Ala His Gly Ala Ala Thr Leu Ser Pro

165

170

- 5 <210> 14
- <211> 1398
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Regiones marco y constantes humanas, CDR de roedor.
- <400> 14

ES 2 729 603 T3

atggctgtgc tggggctgct gttctgcctg gtgacattcc caagctgtgt gctgtcccag 60
 gtgcagctgg tgcagctctgg cgctgaggtg aagaagcctg gcgcctccgt gaaggtctcc 120
 tgcaaggctt ctggctacat cttcatcacc tactggatga cctgggtgcg gcaggcccct 180
 gggcaggggc tggagtggat gggccagatc ttccctgccg gcggctctgc agactacaac 240
 gagaagttcg aaggcagagt caccatgacc acagacacat ccaccagcac agcctacatg 300
 gagctgagga gcctgagatc tgacgacacc gccgtgtatt actgtgccag aggcggtggc 360
 ggattcgtct actggggcca gggcaccctg gtcaccgtct ccagcgctag caccaagggc 420
 ccatcggctt tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 600
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttggggcacc agacctacat ctgcaacgtg 660
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatac ttgtgacaaa 720
 actcacacat gccaccctg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 780
 ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgctg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctctc 1380
 ctgtctccgg gtaaatga 1398

- <210> 15
- <211> 702
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Regiones marco y constantes humanas, CDR de roedor.
- <400> 15

5

10

ES 2 729 603 T3

atggctccag tgcagctgct ggggctgctg gtgctgttcc tgccagccat gagatgtgat 60
atccagatga cccagtctcc atcctccctg tctgcctctg tgggogacag agtgaccatc 120
acctgcagga ccagcgagaa catctacagc tacctggcct ggtatcagca gaagccaggg 180
aagggccccta agctgctgat ctataacgcc aagaccctgg ctgaaggggt gccatccagg 240
ttcagcggca gcggctctgg gacagacttc accctgacca tcagcagcct gcagcctgag 300
gacttcgcca cctactactg tcagcaccac tacggaattc cattcacctt cggccagggc 360
accaaggtgg agatcaagcg tacgggtggct gcaccatctg tgttcatctt ccctccatct 420
gatgagcagc tgaagtctgg aactgcctcc gtgggtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggat aacgcctcc agagcggcaa ctcccaggag 540
agcgtgacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaggtg tacgcctgcg aggtgacca tcagggcctg 660
agcagccccg tgacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa 702

<210> 16
<211> 5
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16

Thr Tyr Trp Leu Gly
1 5

10 <210> 17
<211> 16
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<400> 17

Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

20 <210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 18

Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

25 <210> 19
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens
<400> 19

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

35 <210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
40 <400> 20

ES 2 729 603 T3

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21

Gln Gln Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr Thr
1 5

10 <210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <400> 22

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

20 <210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25 <400> 23

ES 2 729 603 T3

Asp Ile Gln Met 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 Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 24
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

10

ES 2 729 603 T3

Gly Ile Met Ser Pro Val Asp Ser Asp Ile Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Met Ser Val Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Arg Pro Gly Gln Gly Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

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

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

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

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

ES 2 729 603 T3

Asp Ile Gln Met 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 Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Tyr Asn Ile Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu 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> 26

<211> 9

5 <212> PRT

ES 2 729 603 T3

<213> Homo sapiens
<400> 26

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5

5

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 27

10

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

15

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 28

20

His Gly Ser His Asp Asn
1 5

25

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Lys
1 5 10

30

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 30

35

Tyr Asn Asp Gln Arg Pro Ser
1 5

40

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31

Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr His Pro Ala Leu Leu
1 5 10

45

<210> 32
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32

50

ES 2 729 603 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

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

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

5 <210> 33
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 33

10 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr
 85 90 95

His Pro Ala Leu Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

15 <210> 34
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34

ES 2 729 603 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

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

Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr 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

Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

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

ES 2 729 603 T3

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

- <210> 35
- <211> 217
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 35

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

10

ES 2 729 603 T3

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr
 85 90 95

His Pro Ala Leu Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36

5

ES 2 729 603 T3

Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

5 <210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 37

Ile Ile Asp Pro Ser Asn Ser Tyr Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

10 <210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <400> 38

Trp Tyr Tyr Lys Pro Phe Asp Val
1 5

20 <210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 39

25 Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens
<400> 40

Gly Asn Ser Lys Arg Pro Ser
1 5

35 <210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 41

40 Ala Ser Trp Thr Asp Gly Leu Ser Leu Val Val
1 5 10

<210> 42
<211> 117
45 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 42

ES 2 729 603 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Tyr Tyr Lys Pro Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 43
 <211> 111
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 43

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

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

Leu Ser Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 44

ES 2 729 603 T3

<211> 446
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 44

5

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Tyr Tyr Lys Pro Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190

ES 2 729 603 T3

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

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

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

ES 2 729 603 T3

<210> 45
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 45

5

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

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

Leu Ser Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino, que comprende:
- 5 a) un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en el que:
- i) CDRL1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10;
- 10 ii) CDRL2 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11; y
- iii) CDRL3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12;
- y
- 15 b) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en el que:
- i) CDRH1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5;
- 20 ii) CDRH2 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 6-8; y
- iii) CDRH3 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9.
- 25 2. El anticuerpo cristalino antihumano IL-23p19 de la reivindicación 1, que comprende:
- a) un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en el que:
- 30 i) CDRL1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10;
- ii) CDRL2 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11; y
- iii) CDRL3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12;
- 35 y
- b) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en el que:
- 40 i) CDRH1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5;
- ii) CDRH2 comprende la secuencia de las SEQ ID NO: 7; y
- 45 iii) CDRH3 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 9.
3. El anticuerpo antihumano IL-23p19 de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende partículas cristalinas con un tamaño de partícula promedio entre cinco y 200 micras.
- 50 4. El anticuerpo cristalino antihumano IL-23p19 de la reivindicación 2, caracterizado por dimensiones celulares unitarias $a = b = 192 \text{ \AA}$, $c = 106 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ y en el grupo de espacio 14.
5. Una suspensión del anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo está en una concentración de al menos 150 mg/ml.
- 55 6. La suspensión de la reivindicación 5, en la que la viscosidad de la suspensión es inferior a aproximadamente la mitad de la viscosidad de una formulación en solución del mismo anticuerpo a la misma concentración.
7. El anticuerpo IL-23p19 antihumano cristalino de la reivindicación 1, que comprende:
- 60 a) un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende los residuos 1 - 108 de la SEQ ID NO: 4; y
- b) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende los residuos 1 - 116 de una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3.
- 65 8. El anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la reivindicación 7, que comprende:

- a) un dominio variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende los residuos 1 - 108 de la SEQ ID NO: 4; y
- b) un dominio variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende los residuos 1 - 116 de la SEQ ID NO: 2.
- 5 9. El anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la reivindicación 7, que comprende una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo, en la que:
- a) la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4; y
- 10 b) la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3.
10. El anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la reivindicación 9, que comprende una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo, en la que:
- 15 a) la cadena ligera del anticuerpo consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 4; y
- b) la cadena pesada del anticuerpo consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 2.
- 20 11. El anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la reivindicación 7, que comprende además una región constante de cadena pesada que comprende una región constante de cadena pesada humana $\gamma 1$ o que comprende además una región constante de cadena pesada que comprende una región constante de cadena pesada humana $\gamma 4$.
- 25 12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la reivindicación 1 en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
13. El anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la reivindicación 1 para uso como medicamento.
- 30 14. El anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario o proliferativo en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste de artritis, psoriasis, artritis psoriásica, enfermedad inflamatoria del intestino, espondilitis anquilosante e injerto y enfermedad del huésped contra injerto.
- 35 15. El anticuerpo cristalino anti-IL humano de la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, autoinmunitario o proliferativo.
16. Un método para producir un anticuerpo antihumano IL-23p19 cristalino de la reivindicación 1, dicho método comprende:
- 40 a) mezclar una solución de anticuerpo antihumano IL-23p19 y una solución precipitante para obtener una solución de cristalización, dicha solución de cristalización comprende:
- 45 a) un anticuerpo antihumano IL-23p19;
- b) un tampón (pH 4.0 – 8.0);
- c) 5 - 70% (v/v) 1,2 propanodiol; y
- 50 d) PEG 300 o 400;
- b) incubar esa solución de cristalización durante un período de tiempo suficiente para la formación de cristales; y
- c) recolectar los cristales de la solución de cristalización.
- 55 17. El método de la reivindicación 16, en el que el anticuerpo anti-IL-23p19 humano está en una concentración de 5 - 70 mg/ml antes de la adición de la solución precipitante.
- 60 18. El método de la reivindicación 16, en el que el anticuerpo anti-IL-23p19 humano está en una concentración de aproximadamente 100 mg/ml antes de la adición de la solución precipitante.
19. El método de la reivindicación 16, en el que el tampón es ácido cítrico o ácido acético (pH 4.0 - 7.0).
20. El método de la reivindicación 16, en el que el tampón es HEPES o BisTris (pH 5.8 - 8.0).
- 65 21. El método de la reivindicación 16, en el que la incubación se realiza a 10 - 40°C.

22. El método de la reivindicación 16, en el que la solución de cristalización comprende:

- 5 a) un anticuerpo antihumano IL-23p19;
- b) un tampón (pH 4.0 - 6.0);
- c) 2 - 5% (peso/v) de sacarosa;
- 10 c) polisorbato 80 al 0.1 - 0.5% (v/v); y
- d) PEG 300 o 400.

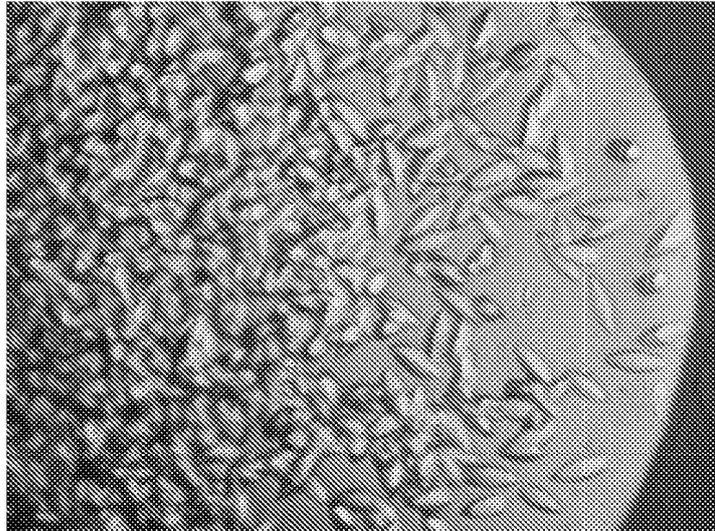


FIG. 1

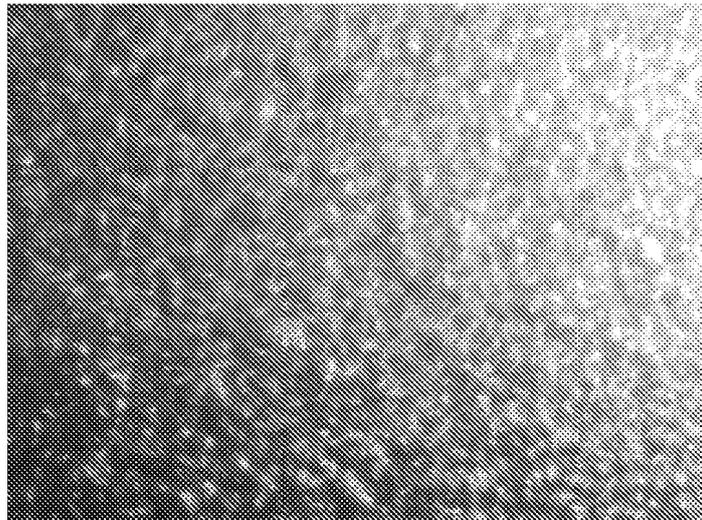


FIG. 2

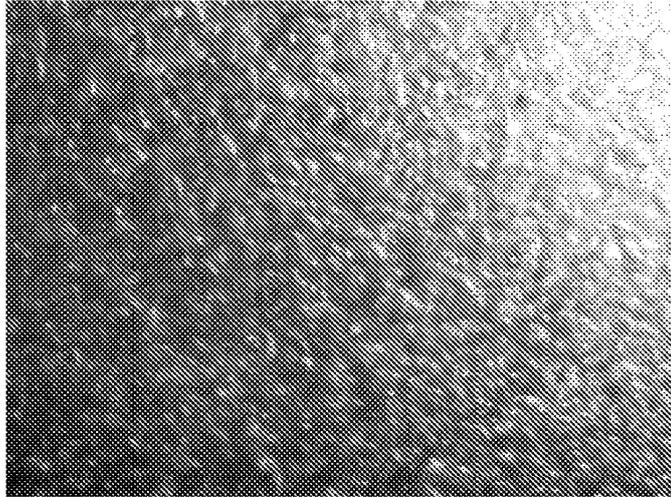


FIG. 3

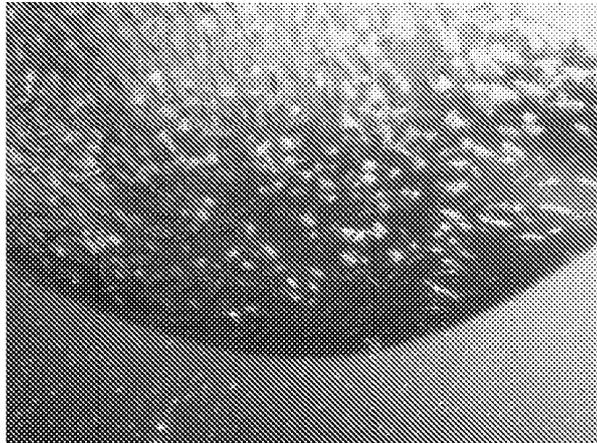


FIG. 4

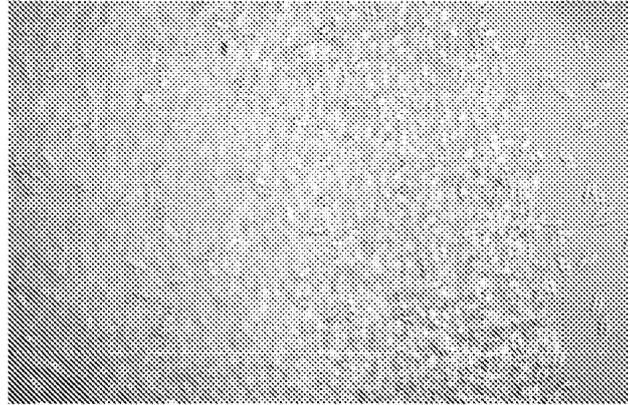


FIG. 5

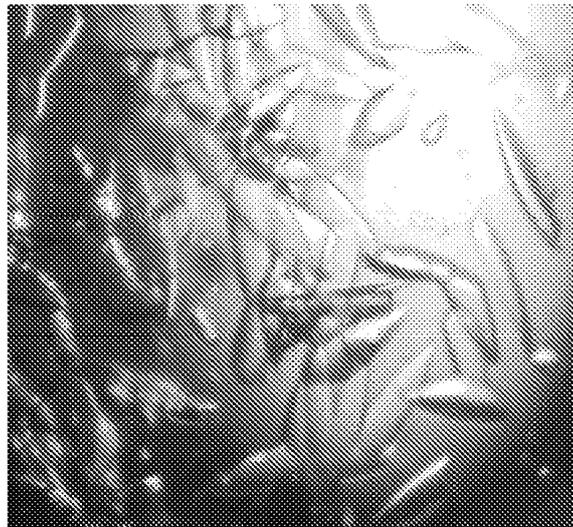


FIG. 6



FIG. 7

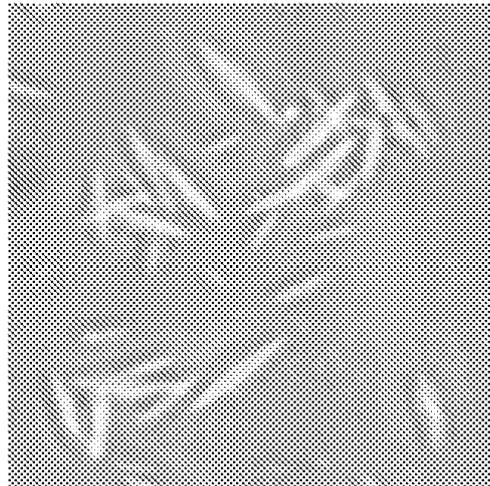


FIG. 8

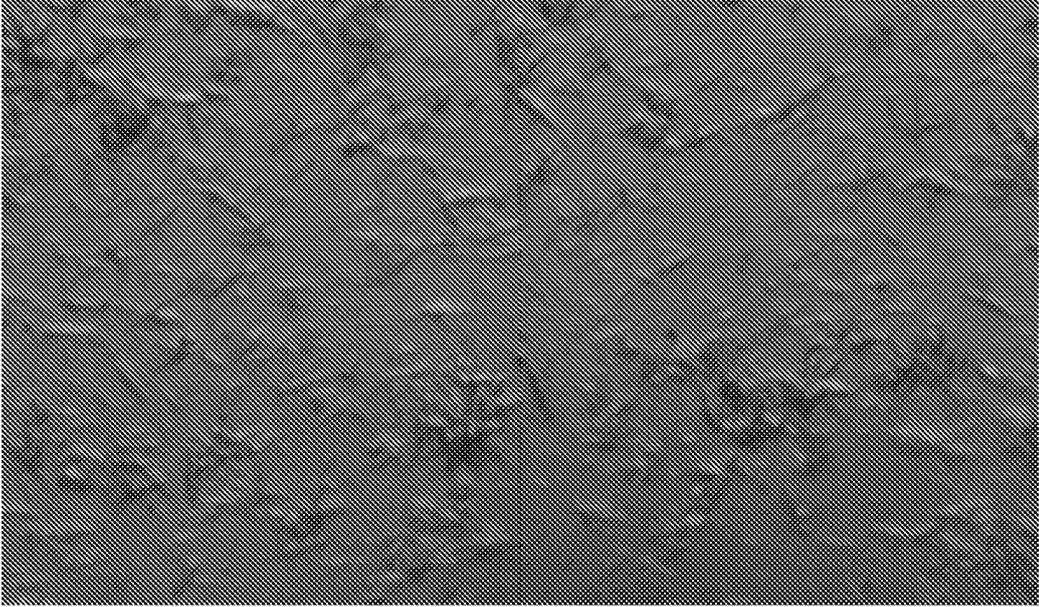


FIG. 9

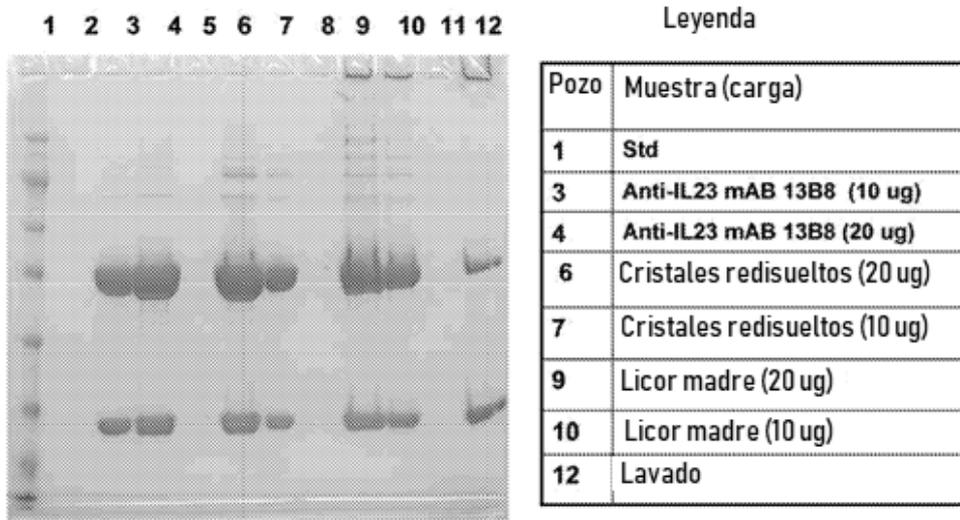


FIG. 10

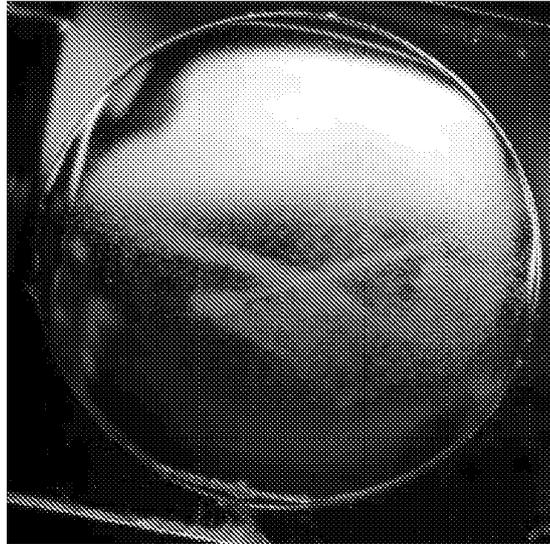


FIG. 11A

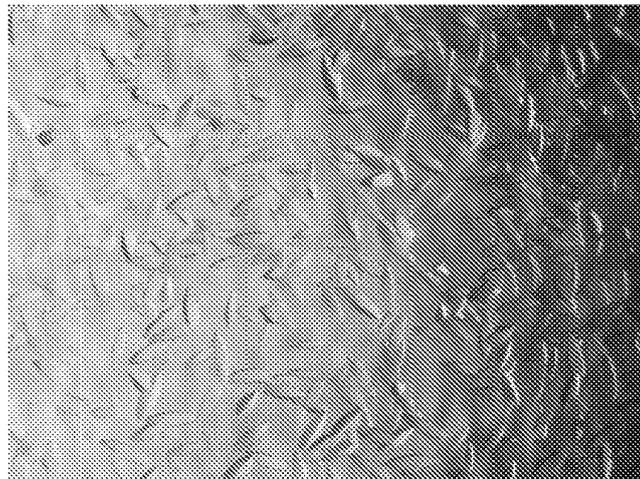


FIG. 11B