

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 422**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2015 PCT/US2015/020383**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15142637**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2015 E 15764397 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3119806**

54 Título: **Anticuerpos para IL-21**

30 Prioridad:

**21.03.2014 US 201461968550 P**

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

**21.07.2020**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**DAVIES, JULIAN;  
MAGRINI, FABIO;  
MARTIN, ANDREA PAULA;  
MOZAFFARIAN, NEELUFAR;  
PATEL, CHETANKUMAR NATVARLAL y  
SCHROEDER, OLIVER**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 774 422 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 para IL-21

La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados manipulados genéticamente que tienen una alta afinidad de unión y neutralizan la IL-21 humana, procedimientos para usar los anticuerpos para tratar afecciones en las que se garantiza el antagonismo o la neutralización de los efectos de la IL-21, tales como condiciones autoinmunes, composiciones y procedimientos para producir recombinantemente los anticuerpos, y composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos.

El documento WO2010/055366 divulga anticuerpos humanos derivados de ratones transgénicos que se dice que se unen y neutralizan la IL-21 humana. Un anticuerpo particular es uno derivado del clon 362,78.

Maurer, M. et al. (Generation and characterization of human anti-human IL-21 neutralizing monoclonal antibodies, 4 MAbs 69 (2012)) describen la generación y caracterización inicial de un panel de anticuerpos monoclonales humanos anti-IL-21 humana derivados de ratones transgénicos con IgG humana, incluyendo el anticuerpo derivado del clon 362,78. Se llevaron a cabo estudios clínicos de un anticuerpo anti-IL-21 descrito en WO2010/055366, US 20130323259A1 y en Maurer et al., a saber, "mAb 362,78", que también se conoce como NN8828 y NNC114-0006 o NNC-0000-0006, en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y enfermedad de Crohn.

El documento WO2012/098113 establece que una estructura cristalina de IL-21 humana en complejo con un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal 362,78 (NNC 0114-0005), cuyo anticuerpo se había mencionado previamente en el documento WO2010/055366, se había formado y analizado utilizando procedimientos de rayos X

El documento WO2012/164021 divulga anticuerpos humanos que incluyen uno que se deriva del clon 366,28.

La presente invención divulgada en el presente documento busca proporcionar alternativas a los anticuerpos anti-IL-21 descritos anteriormente. Los anticuerpos son potencialmente muy adecuados para el tratamiento de afecciones o enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjögren primario (SSE), el síndrome de Sjögren (SS) y el lupus eritematoso sistémico (LES), la enfermedad de Graves, la diabetes tipo 1 y otros, para los cuales pocos tratamientos están disponibles y existe una necesidad médica en todo el mundo. Existe una gran necesidad de tratamientos más eficaces que tengan mejores perfiles de seguridad que los estándares actuales de atención para pacientes.

En particular, la presente invención proporciona anticuerpos que tienen como dominios variables de cadena pesada y liviana el dominio variable de cadena pesada manipulado y humanizado y el dominio variable de cadena liviana del anticuerpo al que se hace referencia en este documento como Ab327.

La presente invención proporciona anticuerpos que tienen una o más de las siguientes propiedades: 1) se unen con alta afinidad a la IL-21 humana y a la IL-21 de mono cynomolgous ( $K_D = 0,8 \pm 0,5 \times 10^{-12}$  M y  $0,3 \pm 0,1 \times 10^{-12}$  M, respectivamente, a 37 °C mediante la unión de equilibrio de solución KinExA); 2) se unen con modesta afinidad a IL-21 de ratón y rata ( $K_D = 2,4 \pm 1,3 \times 10^{-7}$  y  $2,3 \pm 0,2 \times 10^{-7}$  M; respectivamente, a 37 °C mediante la unión de equilibrio de solución KinExA); 3) no se una sustancialmente a ningún otro miembro de la familia de la cadena común y humana (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15); 4) neutralizar la actividad de IL-21 de mono humano y cynomolgous en un ensayo de indicador pan-STAT-IM9-Luciferase particular con un  $IC_{50}$  aproximadamente 6 veces menor que el control positivo, una construcción hIL-21R-Fc (~46,7 pM y -41pM vs. ~271 pM, respectivamente); 5) neutralizar la proliferación inducida por IL-21 humana de células B humanas primarias in vitro con una  $IC_{50}$  de aproximadamente 1,15 nM; 6) neutralizar la diferenciación de células plasmáticas inducidas por IL-21 humana de células B humanas primarias in vitro; 7) bloquean eficazmente la expansión rápida y transitoria de varios tipos de células en el bazo (incluidas las subpoblaciones de células B y T) en ratones inyectados con IL-21 humana; y/u 8) son suficientemente estables para la fabricación farmacéutica, el almacenamiento y el uso terapéutico.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporcionan anticuerpos que se unen a la IL-21 humana que comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) y una región variable de la cadena liviana (LCVR) en la que la LCVR comprende la SEQ ID NO: 7 en CDRL1, SEQ ID NO: 8 en CDRL2 y SEQ ID NO: 9 en CDRL3 y en donde la HCVR comprende SEQ ID NO: 10 en CDRH1, SEQ ID NO: 11 en CDRH2 y SEQ ID NO: 12 en CDRH3, en donde la cadena pesada comprende una HCVR que tiene la SEQ ID NO: 1 y en el que la cadena liviana comprende una LCVR que tiene la SEQ ID NO: 2.

La presente invención proporciona además anticuerpos que se unen a IL-21 humana que comprende dos cadenas pesadas de anticuerpos y dos cadenas livianas de anticuerpos, en las que cada cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 1, y en el que cada cadena liviana comprende un dominio variable de cadena liviana, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpos y se proporcionan dos cadenas livianas de anticuerpos, en las que cada cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 1, y en el que cada cadena liviana comprende un dominio variable de cadena liviana, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 2.

Una realización particular es el anticuerpo Ab327, que es un anticuerpo manipulado y humanizado para la IL-21 humana, cuya secuencia de aminoácidos de cada cadena pesada es la secuencia de SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de cada cadena liviana de la cual es la secuencia de SEQ ID NO: 4.

5 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 La presente invención también incluye moléculas de ADN que codifican las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos de la presente invención para expresar los anticuerpos de la presente invención. En particular, se proporciona una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 3 y que comprende un polinucleótido que codifica la cadena liviana del anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 4. La presente invención proporciona además una molécula de ADN que comprende un polinucleótido cuya secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 5 y que comprende un polinucleótido cuya secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 6.

15 La presente invención incluye células de mamífero para expresar los anticuerpos de la invención por medios recombinantes. En particular, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula de mamífero transformada con una molécula de ADN de la invención descrita anteriormente.

20 Otro aspecto de la presente invención incluye un procedimiento para producir un anticuerpo, que comprende dos cadenas pesadas de anticuerpos y dos cadenas livianas de inmunoglobulina, en las que la secuencia de aminoácidos de cada una de las dos cadenas pesadas es la secuencia de SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de cada una de las dos cadenas livianas es la secuencia de SEQ ID NO: 4, y cuyo procedimiento comprende: a) cultivar una célula de mamífero de la invención, como se describió anteriormente, en condiciones tales que el anticuerpo se expresa y b) recuperar el anticuerpo expresado. La presente invención incluye un anticuerpo obtenible por el procedimiento de la invención como se describe inmediatamente antes.

De acuerdo con aun otro aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo de la presente invención para su uso en terapia.

25 Preferentemente, el anticuerpo de la presente invención es para su uso en el tratamiento de una afección autoinmune.

Más preferiblemente, el anticuerpo de la presente invención es para su uso en el tratamiento del síndrome de Sjögren primario, el síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Grave o la diabetes tipo 1.

El anticuerpo de la presente invención es incluso más preferiblemente para su uso en el tratamiento del Síndrome de Sjögren primario o el Síndrome de Sjögren y es más preferiblemente para su uso en el tratamiento del lupus sistémico.

30 La presente invención incluye procedimientos para usar los anticuerpos, particularmente para tratar afecciones autoinmunes (AI), especialmente el síndrome de Sjögren primario (SSE), el síndrome de Sjögren (SS), el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Grave o la diabetes tipo 1, procedimientos de preparación de los anticuerpos, polinucleótidos que codifican los anticuerpos, vectores que comprenden los nucleótidos para transformar las células huésped y para expresar los anticuerpos, células huésped para expresar los anticuerpos, anticuerpos preparados mediante un procedimiento de expresión recombinante en sistemas huéspedes mamíferos y composiciones farmacéuticas de los anticuerpos que comprende el anticuerpo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Los usos particulares previstos para los anticuerpos son el tratamiento de afecciones AI, en particular afecciones AI como el síndrome de Sjögren primario (SSE), el síndrome de Sjögren (SS), el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Grave o la diabetes tipo 1. La presente invención incluye anticuerpos para su uso en terapia, en el tratamiento de afecciones autoinmunes, en el tratamiento del síndrome de Sjögren primario (SSE), el síndrome de Sjögren (SS), el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Grave o la diabetes tipo 1, y particularmente en el tratamiento del síndrome de Sjögren primario (pSS), síndrome de Sjögren (SS) o lupus eritematoso sistémico. La presente invención incluye el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una afección autoinmune; para su uso en el tratamiento del Síndrome de Sjögren primario (pSS), el Síndrome de Sjögren (SS), el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Grave o la diabetes tipo 1; para tratar el síndrome de Sjögren primario (pSS), el síndrome de Sjögren (SS); o para tratar el lupus eritematoso sistémico. En particular, la presente invención incluye el uso de un anticuerpo de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección autoinmune; Síndrome de Sjögren primario (pSS), Síndrome de Sjögren (pSS), lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Grave o diabetes tipo 1; síndrome de Sjögren primario (pSS), síndrome de Sjögren (SS); o lupus eritematoso sistémico.

#### Breve descripción de las figuras

**Figura 1.** Se muestra la unión de Ab327 a IL-21 humana y otros ligandos que se unen al receptor de cadena gamma común humana mediante ELISA.

55 **Figura 2.** Se muestra que Ab327 neutraliza la proliferación inducida por IL-21 humana de células B humanas primarias in vitro.

**Figura 3.** Porcentaje promedio de cambio de peso corporal desde el inicio en ratones NSG gravemente inmunocomprometidos (IL-2Ry NOD-scid nulo) injertados con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) tratadas con anticuerpo para IL-21 o anticuerpo de control de isotipo durante 42 días. Los tratamientos ocurrieron en los puntos indicados por flechas. Símbolos: - ■ - Ab327 (10 mg/kg); - ▼ - Ab327 (1 mg/kg); - □ -; Control de isotipo (10 mg/kg); - ● - sin injerto.

**Figura 4.** Porcentaje promedio de cambio de peso corporal desde el inicio en ratones NSG severamente inmunocomprometidos (IL-2Ry NOD-scid nulo) injertados con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) tratadas con anticuerpo para IL-21 o anticuerpo de control de isotipo. Los tratamientos ocurrieron en los puntos indicados por flechas. Símbolos: - ■ -Ab327 (10 mg/kg); - □ -; Control de isotipo (10 mg/kg); - ● - sin injerto.

**Figuras 5 y 6.** El tratamiento con anticuerpo IL-21 anti-ratón muestra que alivia la infiltración linfocítica en las glándulas salivales de ratones NOD mediante análisis de ARNm (Figura 5) y análisis histológico (Figura 6, se resumen los linfocitos).

**Figuras 7A y 7B.** Se ha demostrado que el anticuerpo sustituto 728 previene el desarrollo de diabetes autoinmune en ratones NOD. El tratamiento comienza a las 7 semanas de edad (A) como prevención o a las 13 semanas de edad (B) durante la fase prediabética. La incidencia de diabetes se calcula por grupo como dos lecturas consecutivas de más de 250 mg/dl y se muestra como porcentaje de ratones diabéticos por grupo (A: mlgG1 n=12; Ab728 n=12 y B: mlgG1 n=8; Ab728 n=11). La incidencia de diabetes se califica como datos de curva de supervivencia y es diferente mediante la prueba de Logrank (A: p=0,0007 y B: p=0,002).

#### Uso de anticuerpos de la invención

La interleucina (IL)-21 es producida por diversos subconjuntos de células T y se une a un receptor compuesto que consiste en un receptor específico, denominado receptor IL-21 (IL-21R) y la subunidad común de la cadena  $\gamma$ . La IL-21 humana se produce in vivo a partir de una molécula precursora de 162 aminoácidos. La IL-21 humana madura consiste en los residuos 30-162 (133 aminoácidos) de la proteína precursora. Típico de las citoquinas de clase I, la IL-21 tiene una estructura de haz de cuatro hélices dispuestas en una topología de arriba-arriba-abajo-abajo. Utilizando la numeración de la proteína precursora de 162 aminoácidos, se cree que las hélices consisten en los siguientes residuos: Hélice A: 41-56, Hélice B: 69-84, Hélice C: 92-105 y Hélice D: 135-148 Esta estructura está estrechamente relacionada con la de otros miembros de la familia de las citoquinas tipo 1, especialmente IL-2, IL-4 e IL-15.

Tras la unión de IL-21 al complejo receptor y la activación posterior del receptor, la señalización se produce a través de la ruta de señalización Jak-STAT. La cadena IL-21R se une a IL-21 con alta afinidad y proporciona la mayor parte de la energía de unión. Sin embargo, la interacción con la cadena  $\gamma$  común es necesaria para la señalización. La interacción entre IL-21 e IL-21R está mediada por residuos presentes en las hélices A y C y por una pequeña parte del bucle CD que sigue inmediatamente a la hélice C de IL-21 (O. Hamming, et al., Crystal Structure of Interleukin-21 Receptor(IL-21R) Bound to IL-21 Reveals That Sugar Chain Interacting with WSXWS Motif Is Integral Part of IL-21R, 287 J. Biol. Chem. 9454-9460 (2012)).

La IL-21 es una citoquina de clase I que tiene efectos pleiotrópicos sobre las respuestas inmunes innatas y adaptativas, como la estimulación de la proliferación de linfocitos, la promoción de la citotoxicidad de las células T CD8+ y las células NK, y la diferenciación de las células B en células plasmáticas. IL-21 es secretada por las células T CD4+ activadas, en particular las células auxiliares foliculares Th17 y T, así como las células asesinas naturales. Desempeña un papel importante en la promoción del desarrollo de células auxiliares foliculares Th17 y T mediante un mecanismo de avance. Además, IL-21 coopera con otras citoquinas para aumentar la citotoxicidad de las células T CD8+ y promueve la proliferación de células CD8+ en presencia de antígenos. IL-21 también influye en la producción de anticuerpos por las células B. La IL-21 tiene diversas acciones, que incluyen aumentar la proliferación de células T, impulsar la diferenciación de células B en células de memoria y células plasmáticas diferenciadas terminalmente, y aumentar la actividad de las células asesinas naturales. En ciertas condiciones y enfermedades humanas puede ser deseable bloquear la actividad de IL-21. En particular, un anticuerpo que bloquea la unión de IL-21 a su receptor sería deseable en el tratamiento de tales afecciones y enfermedades.

Dadas sus propiedades, los anticuerpos de la presente invención son potencialmente muy adecuados para el tratamiento de afecciones o enfermedades autoinmunes en las que las interacciones célula T - célula B, células Th17, células T foliculares auxiliares, células plasmáticas y células CD8 y NK activadas juegan un papel patogénico predominante. Las enfermedades que se ajustan fácilmente a esta categoría son el Síndrome de Sjögren primario (SSE), el Síndrome de Sjögren (SS) y el lupus eritematoso sistémico (LES), para los cuales hay pocos tratamientos disponibles y existe una gran necesidad médica en todo el mundo. Otras indicaciones potenciales incluyen la enfermedad de Grave y la diabetes tipo 1.

El Síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune sistémica de progresión lenta, que se observa en el 0,5-1,0 % de la población, que afecta predominantemente a mujeres de mediana edad, aunque puede ocurrir a cualquier edad y tanto en hombres como en mujeres. El síndrome de Sjögren primario (pSS) y el síndrome de Sjögren (SS) se caracterizan por la inflamación crónica de las glándulas exocrinas, en particular las glándulas salivales y lagrimales. Las características principales de pSS son la sequedad oral y ocular ("Síndrome de Sicca") y el sello histológico es la

infiltración linfocítica focal de las glándulas exocrinas, que puede determinarse mediante una biopsia de glándula salival labial menor. Las características de Sicca afectan la calidad de vida y causan complicaciones locales en la mucosa involucrada. La boca seca severa es una condición desagradable e incapacitante. Sin embargo, en muchos pacientes se presentan manifestaciones extraglandulares y pueden afectar a casi cualquier órgano. Actualmente no hay agentes modificadores de la enfermedad aprobados para tratar SSP y SS. Los medicamentos abordan los síntomas y brindan terapia de apoyo. Existe la necesidad de terapias más eficaces con mejores perfiles de seguridad para pacientes con SSP y SS. La intervención farmacológica con los anticuerpos de la presente invención puede afectar varios aspectos del sistema inmune desregulado que parecen estar causalmente relacionados con la patogénesis de SSP y SS y, por lo tanto, podrían proporcionar un beneficio clínico significativo para los pacientes. Esta terapia también puede reducir la necesidad de agentes inmunosupresores crónicos (no específicos), proporcionando una mejora en la calidad de vida para pacientes con SSP y SS.

#### Tratamiento y administración

Los términos "tratamiento", "que trata" o "tratar" y similares incluyen restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad de un síntoma, afección, enfermedad o trastorno existente en un paciente. El término "paciente" se refiere a un humano. El término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o dosis de un anticuerpo de la invención que, tras la administración de dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente. Una cantidad efectiva puede ser determinada fácilmente por el médico asistente de diagnóstico o el profesional de atención sanitaria, como un experto en la técnica, utilizando técnicas conocidas y observando los resultados. Al determinar la cantidad efectiva para un paciente, se pueden considerar una serie de factores, incluidos el tamaño, la edad y el estado general de salud del paciente; la enfermedad o trastorno específico involucrado; la gravedad de la enfermedad, afección o trastorno; la respuesta del paciente individual; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otros factores relevantes.

Los anticuerpos de la invención están destinados a la administración parenteral a humanos para tratar afecciones autoinmunes. Se prefieren las rutas subcutánea e intravenosa. Los anticuerpos pueden formularse en soluciones farmacéuticas acuosas antes de la administración. Una dosis intravenosa de carga puede ser administrada por un profesional de la salud. En general, se espera que la administración se realice mediante inyección subcutánea, ya sea autoadministrada por el paciente o por otra persona, como un profesional de atención sanitaria. Para inyecciones subcutáneas, se puede usar un autoinyector o una jeringa precargada. Las dosis pueden ser fijas, es decir, la misma masa de anticuerpo activo para cada paciente, o pueden basarse en el peso corporal (masa). Sobre una base de peso corporal (masa), las dosis estarán preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 30 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal (masa) del paciente. Más preferiblemente, la dosis estará en el rango de 0,1 a 20 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal (masa) del paciente. Se espera que la frecuencia de dosificación sea semanal o menos frecuente, dependiendo de la farmacocinética y farmacodinámica reales en humanos. La duración del tratamiento variará dependiendo de muchos factores y será determinada por el diagnóstico del paciente o el proveedor de atención sanitaria que lo atienda, según la experiencia y la habilidad en la técnica. La frecuencia y la duración del tratamiento pueden variar según la indicación.

#### Estructura de los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos de la invención tienen una estructura terciaria y cuaternaria típica para un anticuerpo IgG humano de longitud completa. Cuando se biosintetizan en una célula huésped de mamífero adecuada, los anticuerpos de la invención se secretarán como moléculas que consisten en dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, cadenas que se unen covalentemente mediante enlaces disulfuro intracadena e intercadena de la manera habitual, con las cadenas pesadas unidas entre sí y una cadena liviana unida a cada una de las cadenas pesadas. Las posiciones de los enlaces disulfuro intracadena e intercadena son bien conocidas.

Cada cadena pesada contiene cuatro dominios: desde el terminal N al terminal C, dominio variable de la cadena pesada, dominios IgG CH1, IgG CH2 e IgG CH3. Una región de bisagra entre CH1 y CH2 contiene un enlace disulfuro entre cadenas o enlaces que unen las dos cadenas pesadas. Cada cadena liviana contiene dos dominios: desde el terminal N al terminal C, dominio variable de cadena liviana y un dominio de dominio constante de cadena liviana (CL). Se prefiere que los dominios constantes pesados sean IgG4 humana o variantes de los mismos. Se prefiere que el dominio constante liviano sea kappa humano. Las regiones variables juntas son responsables de las propiedades funcionales de unirse a la IL-21 humana y neutralizar la actividad de la IL-21 humana. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de los anticuerpos de la invención se proporcionan en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, Ab327, se proporcionan dentro de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. El sitio de glicosilación unido a N en Asn294 de la SEQ ID NO: 3 puede estar glicosilado.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (HC) de los anticuerpos consiste en el dominio variable de la cadena pesada de la presente invención, SEQ ID NO: 1, fusionado en su terminal C para dominios constantes de la cadena pesada humana apropiada (CH1, CH2 y CH3) o variantes estructuralmente similares de los dominios constantes de la cadena pesada humana que pueden tener una mutación o mutaciones bien conocidas para mejorar la estabilidad o reducir las funciones efectoras. Se prefieren las variantes de los dominios constantes de IgG4 humana

que tienen mutaciones relacionadas con la estabilidad y/o la función efectora reducida. La SEQ ID NO: 3 proporciona la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Ab327.

5 La secuencia de aminoácidos de la cadena liviana (LC) consiste en el dominio variable de la cadena liviana de la presente invención, SEQ ID NO: 2, fusionado en su terminal C a un dominio constante de la cadena liviana (CL) humana apropiada o una variante estructuralmente similar de la misma. Se prefiere el dominio constante de la cadena liviana kappa humana. La SEQ ID NO: 4 proporciona la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de Ab327. Para expresar Ab327, las secuencias de ADN proporcionadas por SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 pueden usarse para HC y LC, respectivamente.

10 Las CDR L1, L3 y H2 se asignaron de acuerdo con la convención de Kabat y las CDR L2, H1 y H3 se asignaron de acuerdo con la convención de North. Kabat EA, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991); North B, et al, J Mol Biol 2011 Feb 18; 406(2): 228-256.

#### Producción de los anticuerpos de la invención.

15 Los anticuerpos de la presente invención se pueden biosintetizar, purificar y formular para la administración por procedimientos bien conocidos. Una célula huésped apropiada, como HEK 293 o CHO, se transfecta de manera transitoria o estable con un sistema de expresión para secretar anticuerpos usando una relación de vector HC:LC predeterminada si se usan dos vectores, o un sistema de vector único que codifica tanto la cadena pesada como la cadena liviana. Los vectores adecuados para la expresión y secreción de anticuerpos de estas células huésped comúnmente utilizadas son bien conocidos.

20 Después de la expresión y secreción del anticuerpo, el medio se clarifica para eliminar células y el medio clarificado se purifica usando cualquiera de las muchas técnicas de uso común. Por ejemplo, el medio se puede aplicar a una columna Protein A que se ha equilibrado con un tampón, como solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). La columna se lava para eliminar componentes de unión no específicos. El anticuerpo unido se eluye, por ejemplo, por gradiente de pH (tal como tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8 hasta tampón de citrato de sodio 0,1 M pH 2,5).  
25 Las fracciones de anticuerpos se detectan, como por SDS-PAGE, y luego se reúnen. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso previsto. El anticuerpo puede concentrarse y/o filtrarse hasta esterilidad usando técnicas comunes. Otros materiales distintos al anticuerpo, como la célula huésped y los componentes del medio de crecimiento, y los agregados solubles y los multímeros del anticuerpo, se pueden reducir o eliminar de manera efectiva mediante técnicas comunes, que incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, interacción hidrófoba, intercambio catiónico, intercambio aniónico, afinidad o en hidroxiapatita. La pureza del anticuerpo después de estos pasos de  
30 cromatografía es típicamente mayor del 95 %. El producto puede almacenarse a 4 °C, congelarse a -70 °C o puede liofilizarse.

35 El Ab327 usado en los estudios descritos en este documento se expresó de forma transitoria en células HEK293 después de la cotransfección de vectores de ADN de expresión de cadena pesada y cadena liviana separados que incorporaron las secuencias de ADN de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente, o se expresó de forma estable en células CHO después de la transfección de un único vector de ADN que incorporaba las secuencias de ADN de las SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, que codifican la cadena pesada y la cadena liviana, respectivamente. El medio cosechado de un cultivo HEK293 de 5 días o de un cultivo en masa de CHO de 14 días se aclaró y el sobrenadante bruto resultante se purificó por cromatografía en Protein A. El Ab327 se unió a la resina Protein A y se eluyó usando tampón de pH bajo. El anticuerpo eluido se purificó adicionalmente usando cromatografía preparativa de exclusión por tamaño (SEC), para el material producido a partir de transfección transitoria de HEK293, o usando cromatografía de intercambio aniónico multimodal (Capto adhere® GE Healthcare Life Sciences) como paso de depuración para el material producido a partir de transfección estable de CHO. La pureza final del Ab327 se evaluó mediante SDS-PAGE, SEC-HPLC analítica y análisis por LC/MS. Se demostró que los niveles de endotoxina eran <1  
45 EU/mg usando el análisis Endosafe-PTS. El Ab327 purificado se almacenó en PBS (solución salina tamponada con fosfato), pH 7,2 a 4 °C.

#### Composiciones farmacéuticas de los anticuerpos de la presente invención

50 El anticuerpo purificado puede formularse en composiciones farmacéuticas de acuerdo con procedimientos bien conocidos para formular proteínas y anticuerpos para administración parenteral, particularmente para administración subcutánea o intravenosa. El anticuerpo puede liofilizarse, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados, y luego reconstituirse con un diluyente a base de agua antes de su uso. Alternativamente, el anticuerpo puede formularse en una solución acuosa y almacenarse hasta 1 a 3 años antes de su uso. En cualquier caso, la forma almacenada y la forma inyectada de las composiciones farmacéuticas del anticuerpo probablemente contendrán un excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables, que son ingredientes distintos del anticuerpo. El hecho de que un ingrediente sea farmacéuticamente aceptable depende de su efecto en la seguridad y efectividad, o de la seguridad, pureza y potencia de la composición farmacéutica. Si se considera que un ingrediente tiene un efecto suficientemente desfavorable en la seguridad o efectividad (o en la seguridad, pureza o potencia) para garantizar que no se use en una composición para la administración a humanos, entonces no es farmacéuticamente aceptable para ser usado en una composición farmacéutica del anticuerpo.

Una composición en solución del anticuerpo típicamente estará basada en agua y puede contener, además de agua, excipientes tales como un sistema de tampón, un conservante si está destinado a múltiples usos, un agente quelante, un agente de tonicidad para ajustar el tonicidad de la composición para aproximarse a la del tejido humano, y/o un agente o agentes solubilizantes o estabilizantes, tales como un detergente, un tensioactivo o similares. Lograr formulaciones adecuadamente estables para el almacenamiento a largo plazo en la solución puede ser todo un desafío. La solubilidad y la estabilidad química y física pueden mejorarse utilizando procedimientos de diseño de experimento variando, por ejemplo, el pH, la inclusión (o no) de diversos excipientes, y el tipo y la concentración de los excipientes. Una fuente de información general sobre la formulación de medicamentos es Remington: The Science and Practice of Pharmacy. W. Wang, et al., Antibody Structure, Instability, y Formulation, 96 J. Pharm. Sci. 1-26 (2007) que es una fuente general útil para formular anticuerpos.

Se describirán ahora varias características y realizaciones preferidas de la presente invención solo a modo de ejemplo y ensayos no limitantes con referencia a las figuras adjuntas.

### Ejemplo 1

#### Generación de anticuerpos, manipulación y humanización para obtener Ab327

Se aisló un anticuerpo anti-IL-21 humano de ratón, 15H12, después de inmunizaciones en almohadilla de la pata de ratón y la clonación de regiones variables anti-IL-21. Se inmunizaron ratones Balb/c usando procedimientos de inmunización estándar con IL-21 humana obtenida comercialmente. Tres a cinco días después del refuerzo final no adyuvante, se recolectaron los ganglios linfáticos y/o bazo, y se generaron suspensiones unicelulares. Las células específicas de antígeno se enriquecieron mediante procedimientos de clasificación estándar usando IL-21 biotinilada o marcada con fluoróforo y se cultivaron conjuntamente con células alimentadoras durante dos semanas antes de la clonación de dominios variables de ratón. El anticuerpo se identificó usando un ELISA de captura de anti-IL-21 y se demostró que bloquea y neutraliza la IL-21 en ensayos in vitro, con una  $K_D$  de aproximadamente 5 pM para la IL-21 humana y la IL-21 de mono cynomolgus. Los fragmentos de anticuerpos Fab se capturaron con un anticuerpo kappa antihumano de cabra y luego se seleccionó la capacidad de unirse a IL-21 marcada con biotina lo que a su vez se detectó mediante neutravidina marcada con fosfatasa alcalina.

El anticuerpo se optimizó adicionalmente para unirse tanto a IL-21 de ratón como a humano para producir el anticuerpo de ratón 15M2. Para lograr esto, las CDR de los VH y VL murinos aislados de 15H12 se aleatorizaron mediante mutagénesis y los anticuerpos resultantes se seleccionaron para su unión a la IL-21 humana y de ratón usando un ELISA. Las mutaciones potenciadoras de la afinidad se combinaron para producir 15M2, que luego se humanizaron usando una metodología de biblioteca marco. Para la biblioteca marco, doce genes de línea germinal marco VH humanos (1-24, 1-46, 1-69, 2-5, 3-15, 3-23, 3-53, 3-72, 4-04, 4-39, 5-51 y 6-01) y ocho genes marco VL humanos (A-19, A-26, A-27, B-2, B-3, L-2, L-12 y O-2) que contenían CDR de 15M2 se sintetizaron y clonaron en vectores de expresión de IgG4 humana de cadena pesada y liviana. Después de la transfección transitoria con 293 HEK de las 96 combinaciones de cadenas pesadas y livianas, los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA para determinar la unión a IL-21 humana recubierta directamente sobre una placa y a IL-21 biotinilada en solución después de la captura de IgG humana de sobrenadantes con un anti-anticuerpo kappa humano. Considerando la capacidad de desarrollo y la actividad de ELISA, se eligió un anticuerpo humanizado con CDR derivadas del anticuerpo 15M2, utilizando el marco humano de cadena pesada 1-46 y el marco de cadena liviana humana O2, para una optimización adicional. Su  $K_D$  para la IL-21 humana fue de aproximadamente 0,5 pM.

El análisis del anticuerpo humanizado identificó un sitio de desamidación de la CDR de cadena liviana (Asn92) y un sitio de isomerización de la CDR de cadena pesada (Asp55). Para eliminar estos puntos críticos de degradación química, se generó un anticuerpo manipulado que contiene mutaciones de Asp55Glu de cadena pesada y Asn92His de cadena liviana. Estas mutaciones causaron cierta pérdida de afinidad, a aproximadamente 2 pM  $K_D$  para humanos y monos cynomolgus IL-21. Se determinó que la pérdida de afinidad se atribuía a la mutación Asp55Glu. Como resultado, el residuo Asp55 se mantuvo en la cadena pesada junto con la mutación Asn92His en la cadena liviana. Los principios de ingeniería racional guiaron una mayor optimización de la afinidad mediante la ingeniería del residuo vecino Ser56 cercano en la cadena pesada. A partir de esto, se seleccionó un anticuerpo manipulado que contenía una mutación Ser56Val que reducía simultáneamente la isomerización de Asp55 y mejoraba la afinidad. El anticuerpo final tiene una afinidad de aproximadamente 0,5 pM tanto para el IL-21 humano como para el de mono cynomolgus. La región constante se seleccionó para ser IgG4 humana, con mutaciones puntuales para evitar la formación de medio anticuerpo (S225P) y para reducir las funciones efectoras (F231A/L232A). El análisis Epivax in silico no mostró puntos críticos de inmunogenicidad discernible. La información de secuencia para el anticuerpo humanizado final manipulado ("Ab327") se muestra en la Tabla 1 dada a continuación.

Tabla 1

SEQ ID NO:	Identidad	Longitud	Secuencia de aminoácidos
1	Dominio variable de cadena pesada	117	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGLID TSDVYTIYNQKFKGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARYGPLAMDY WGQGTLVTVSS
2	Dominio variable de cadena liviana	106	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDI SNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQFHTLRITFGGGTKVEIK
3	Cadena pesada	443	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY TFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGLID TSDVYTIYNQKFKGRVTMTRDTSTSTV YMELSSLRSEDTAVYYCARYGPLAMDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS SLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLG

(continuación)

SEQ ID NO:	Identidad	Longitud	Secuencia de aminoácidos
4	Cadena liviana	213	DIQMTQSPSSLSASVVGDRVTITCRASQDI SNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAT YYCQQFHTRLRTFGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC

#### Características de solubilidad y estabilidad de Ab327

5 Las propiedades fisicoquímicas de Ab327 relacionadas con la solubilidad y la estabilidad se evaluaron en formulaciones de citrato 10 mM, pH 6 (C6) y citrato 10 mM, pH 6 + NaCl 150 mM (C6N). Para la formulación C6, la solubilidad fue  $\geq 122,9$  mg/ml y la solubilidad en la formulación C6N fue  $\geq 130,9$  mg/ml. Se determinó que la viscosidad de Ab327 a 100 mg/ml en citrato 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 80 al 0,02 %, pH6 (C6NT) era de 5,8 cP.

10 Después de 4 semanas a 25°C en citrato 10 mM, tampón de pH 6, los cambios en la heterogeneidad química y física fueron bajos para Ab327, con un cambio de menos del 5 % en el área del pico principal observado por cromatografía de intercambio catiónico analítica (CEX). En las mismas condiciones, se observó un crecimiento agregado de  $<0,5$  % de alto peso molecular (HMW) mediante cromatografía de exclusión analítica (SEC). Las muestras de citrato con estabilidad de pH 6 no mostraron pérdida de bioactividad en un ensayo basado en células después de 4 semanas a 40 °C.

15 El anticuerpo se analizó después de 4 semanas a 4 °C, 25 °C y 40 °C en C6 mediante mapeo de péptidos por LC-MS para la caracterización de puntos críticos de degradación química de la CDR. El análisis LC-MS no mostró una isomerización significativa del residuo Asp55 de CDR de cadena pesada a 40 °C con respecto a la muestra de control a 4 °C. Se identificaron otras degradaciones comunes de CDR que crecieron más del 0,5 % después de 4 semanas a 25 °C en relación con la muestra de control de 4 °C y colectivamente en los 6 CDR totalizaron menos del 5 %.

20 La estabilidad física de Ab327 se evaluó con un estudio de congelación y descongelación rápida de 1 mg/ml y un estudio de congelación y descongelación lenta de 50 mg/ml en C6. Durante ambos estudios, la presencia de Tween 80 redujo la formación de partículas de tamaño de 10 micras. En el estudio de alta concentración, la presencia de sal NaCl 150 mM redujo la formación de agregados de HMW. Para el estudio de baja concentración, el agregado de HMW fue de 0,7 % en presencia de sal y Tween 80. En conclusión, el Ab327 parecía tener buenas propiedades de solución, incluidas la viscosidad, la solubilidad y la estabilidad, para proceder a estudios en humanos.

#### 25 Propiedades funcionales de Ab327

##### Unión de Ab327 a IL-21 humana y otros miembros de la familia de receptores de cadena gamma común humana por ELISA

30 El objetivo de este estudio fue determinar la especificidad de unión de Ab327 a la IL-21 humana en comparación con los otros miembros de las citoquinas del receptor de la cadena gamma común (yc). La familia de la cadena yc del receptor de citoquina consta de seis miembros, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Todos los miembros de esta familia señalan a través de complejos receptores que contienen la subunidad yc. La especificidad de Ab327 para unirse a otros miembros de la familia de citoquinas de la cadena yc humana se determinó usando un ELISA. En resumen, se capturó Ab327 en una placa de ELISA recubierta con IgG kappa anti-humano de cabra. Las citoquinas marcadas con biotina titulada a partir de 100 nM-780 pM se agregaron luego a la placa durante 1 hora a 37 °C y se detectó cualquier citoquina unida usando Neutravidina marcada con fosfatasa alcalina. El anticuerpo monoclonal de ratón comercialmente disponible para IL-2 y los anticuerpos policlonales de cabra para IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 capturados con IgG anti-cabra de asno dieron señales positivas después de unir las citoquinas biotiniladas y la detección con Neutravidina. Sin embargo, no se observó señal detectable para Ab327, excepto con IL-21 humana (véase la Tabla 2 a continuación, que muestra la unión de Ab327 y otros ligandos que se unen al receptor de cadena gamma común humana mediante ELISA como se muestra como medición de densidad óptica (OD) a 560 nm. Véase también la Figura 1). Estos resultados indican que el Ab327 es específico para IL-21 y no se une a otras citoquinas de la familia de receptores de la cadena yc humana.

Tabla 2

Proteína	Conc. de proteína (nM)	100	33	11	3,7	1,2	0,41	0,14	0,05
IL-2	Control positivo	1,25	0,59	0,24	0,13	0,10	0,08	0,09	0,09
	Ab327	0,07	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09
IL-4	Control positivo	1,78	1,75	1,63	1,44	1,18	0,92	0,54	0,27
	Ab327	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
IL-7	Control positivo	2,88	2,85	2,73	1,96	0,92	0,37	0,18	0,12
	Ab327	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,08
IL-9	Control positivo	1,70	1,21	0,68	0,34	0,18	0,12	0,10	0,09
	Ab327	0,07	0,07	0,07	0,11	0,07	0,07	0,07	0,07
IL-15	Control positivo	1,70	1,49	1,21	0,87	0,44	0,21	0,14	0,09
	Ab327	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,11	0,08	0,07
IL-21	hIgG4	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	Ab327	0,81	0,81	0,76	0,76	0,71	0,52	0,34	0,20

#### Afinidad de unión de Ab327 para IL-21 humana, de mono Cynomolgus, ratón, rata y conejo

5 El Ab327 es un anticuerpo de IgG4 monoclonal humanizado manipulado que se une a y neutraliza la IL-21 humana. El propósito de este estudio fue determinar la afinidad de unión de Ab327 para IL-21 humana, de mono cynomolgus, ratón, rata y conejo (las secuencias se dan más adelante). La aparente afinidad de unión ( $K_D$ ) de Ab327 a estas diversas especies de IL-21 se determinó usando un instrumento KinExA 3000 a 37 °C. Los experimentos de unión en equilibrio en solución de KinExA se realizaron usando un protocolo de concentración de anticuerpo fija y diluciones en serie de 2 veces de IL-21. Las muestras se equilibraron a 37 °C durante 6-36 horas antes del análisis. El anticuerpo libre en las muestras equilibradas se detectó usando un anticuerpo policlonal IgG Fc anti-humano conjugado con Dylight 649. Los datos de porcentaje de anticuerpo libre versus concentración de antígeno resultantes se ajustaron a un modelo de unión de "afinidad estándar" usando el software KinExA Pro, y se determinó el mejor valor de afinidad de unión ( $K_D$ ).

15 El  $K_D$  promedio de tres experimentos independientes junto con la desviación estándar (humano, mono cynomolgus, ratón y rata) o de una sola determinación (IL-21 de conejo) se resume en la Tabla 3 a continuación (afinidad aparente de unión en equilibrio en solución ( $K_D$ ) de Ab327).

Tabla 3

Especie de IL-21	Número de determinaciones independientes	Afinidad de unión aparente en equilibrio en solución de Ab327 a 37 °C $K_D$ (M)
Humana	3	$0,8 \pm 0,5 \times 10^{-12}$
Mono Cynomolgous	3	$0,3 \pm 0,1 \times 10^{-12}$

(continuación)

Especie de IL-21	Número de determinaciones independientes	Afinidad de unión aparente en equilibrio en solución de Ab327 a 37 °C $K_D$ (M)
Ratón	3	$2,4 \pm 1,3 \times 10^{-7}$
Rata	3	$2,3 \pm 0,2 \times 10^{-7}$
Conejo	1	$>2 \times 10^{-7}$

El Ab327 se unió a la IL-21 humana y de mono cynomolgus con una afinidad media (n=3) de  $0,8 \pm 0,5 \times 10^{-12}$  M y  $0,3 \pm 0,1 \times 10^{-12}$  M, respectivamente, a 37 °C. El Ab327 se unió a IL-21 de ratón, rata y conejo con una afinidad de  $2,4 \pm 1,3 \times 10^{-7}$  M,  $2,3 \pm 0,2 \times 10^{-7}$  M y  $>2 \times 10^{-7}$  M, respectivamente. La unión a la IL-21 de conejo se estimó con base en una señal de unión que fue menor que la observada para muestras equivalentes de IL-21 de ratón y rata. Con base en estos resultados, el Ab327 tiene una afinidad de nivel aproximadamente picomolar por la IL-21 humana y del mono cynomolgus, pero una afinidad relativamente débil por la IL-21 de ratón, rata y conejo.

El Ab327 inhibió la IL-21 humana y de mono Cynomolgus en un ensayo informador de pan-STAT-Luciferasa IM9 in vitro.

La IL-21 activa las proteínas tirosina quinasas de la familia JAK que median la activación dependiente de IL-21 del Transductor de Señal y el Activador de Transcripción (STAT). La capacidad de IL-21 para activar la ruta STAT se evaluó utilizando células IM9. Las células IM9, que son una línea celular linfoblastoide B transformada con EBV derivada de la sangre de un paciente con mieloma múltiple y que expresan naturalmente el receptor IL-21 (IL-21R) y su correceptor (yc), se transfectaron de manera estable con una construcción informadora pan-STAT-luciferasa. Usando un ensayo informador IM9-panSTAT-luciferasa, el propósito de este experimento fue determinar si Ab327 podría inhibir la activación de STAT dependiente de IL-21.

Las células IM9-panSTAT-luciferasa (subclón de células IM9 1B10/3G2 con indicador de luciferasa pan-STAT) se cultivaron rutinariamente en medio (RPMI1640, 10 % de FBS, 1X pluma/estreptococo, zeocina 100 µg/ml para la selección de pan-STAT-luciferasa reportero) en matraces. Para el ensayo, las células se sembraron a 50.000 células/50 µl/pozo en placas tratadas con TC y se incubaron durante la noche a 37 °C. Luego, las células se trataron con Ab327 en presencia de proteínas recombinantes IL-21 de diferentes especies. Se evaluó un rango de dosis de Ab327 de 0 a 6670 pM (la concentración final se basó en MW de Ab327 = 150 kDa). Se añadió IL-21 recombinante de diferentes especies a cada pozo a una concentración final de 66,67 pM (con base en MW = 15 kDa). Se usó una quimera IL-21R: Fc humana (R&D Systems, cat#991-R2) como control positivo y se usó IgG4 humana como control negativo. Se evaluó un rango de dosis para el control positivo y negativo de 0 a 47520 pM. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Las placas de 96 pozos se colocaron en una incubadora para cultivo de tejidos (37 °C, 95 % de humedad relativa, 5 % de CO<sub>2</sub>) durante 4 horas. Se añadieron 100 µl/pozo de solución de Luciferasa One-Glo para detener el ensayo. Se usó un luminómetro (Perkin Elmer Victor3) para leer las placas.

Los resultados se expresan como IC<sub>50</sub> (la mitad de la concentración inhibitoria máxima) y se calculan usando un ajuste sigmoidal de 4 parámetros de los datos (gráfica Sigma). El IC<sub>50</sub> promedio de tres experimentos independientes y las desviaciones estándar se presentan en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

IC <sub>50</sub> (pM)	IL-21 Humana	IL-21 Cyno	IL-21 Ratón	IL-21 Rata	IL-21 Conejo
Ab327	$46,7 \pm 2,4$	$48,3 \pm 5,9$	N.N.D.	N.N.D.	N.N.D.
hIL21R-Fc	$271 \pm 15,6$	$3922 \pm 525$	$3533 \pm 543$	N.N.D.	$321 \pm 76,2$

Dentro del rango probado, el Ab327 inhibió completamente la actividad de STAT inducida por IL-21 humana y de mono cynomolgus de una manera dependiente de la dosis. La inhibición por Ab327 fue mayor que la observada con el control positivo (hIL-21R:Fc), con Ab327 con un IC<sub>50</sub> de  $46,7 \pm 2,4$  versus  $271 \pm 15,6$  para el control positivo. El anticuerpo de control de isotipo (hIgG4) no inhibió la actividad pan-STAT (datos no mostrados). En conclusión, Ab327 neutralizó

efectivamente la actividad de IL-21 humana y de mono cynomolgus in vitro, pero no neutralizó IL-21 de ratón, rata o conejo (secuencias dadas anteriormente) en estas condiciones (N.N.D. = neutralización no detectada).

#### El Ab327 neutralizó la proliferación inducida por IL-21 humana de células B humanas primarias in vitro.

5 La función principal de las células B es producir anticuerpos que neutralizan y eliminan los patógenos. Las células B productoras de anticuerpos se generan a partir de células B ingenuas durante las reacciones del centro germinal (GC). Los GC se establecen cuando las células B encuentran antígenos específicos y reciben señales instructivas de las células T foliculares auxiliares para el crecimiento, la supervivencia, la selección y la diferenciación. Entre esas señales, las células B son estimuladas por CD40 y numerosas citoquinas, siendo IL-21 un factor clave para promover la proliferación, el cambio de isotipo, la diferenciación de células plasmáticas y la secreción de anticuerpos. El objetivo era determinar si Ab327 podía inhibir la proliferación inducida por IL-21 de células B humanas primarias.

10 Se obtuvieron capas leucocíticas de cinco donantes sanos del Indiana Blood Center. Las PBMC se aislaron de las capas leucocíticas mediante separación por gradiente Ficoll-Paque y las células B CD19+ se seleccionaron positivamente con perlas magnéticas anti-CD 19 (Miltenyi Biotec). La pureza de la población recuperada fue típicamente >90 %. Para evaluar las respuestas proliferativas de células cultivadas, se cultivaron células CD19+ purificadas a 0,5 millones de células/ml (0,1 millones de células/pozo) en placas de cultivo de fondo plano de 96 pozos con estimuladores apropiados (RPMI-1640/FBS al 10 % que contenía sodio 1 mM piruvato, aminoácidos no esenciales, HEPES 10 mM pH 7,0, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml) durante 5 días a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células B aisladas se incubaron con una combinación de IL-21 humana a 3,33 nM (basada en MW = 15k Da) y CD40 antihumano 2 µg/ml (BD Pharmingen). Se evaluó un rango de dosis de Ab327 (de 0,1 nM a 26,7 nM), quimera IL-21R humana:Fc (de 0,1 nM a 213,3 nM, R&D Systems) o IgG4 humana (de 0,1 nM a 26,7 nM). Todos los estímulos y tratamientos se agregaron al inicio del cultivo. Después de 5 días de cultivo, se midió la absorción de [metil-<sup>3</sup>H]timidina usando un contador de centelleo líquido.

15 Los resultados se expresan como porcentaje de proliferación máxima, con estimulación mediada por IL-21 en ausencia de anticuerpo siendo 100 %. La concentración donde se inhibió el 50 % de la respuesta inducida por IL-21 (IC<sub>50</sub>) por Ab327 se calculó usando un ajuste sigmoide de 4 parámetros de los datos. El Ab327 inhibió la proliferación inducida por IL-21 de células B humanas primarias de una manera dependiente de la dosis. Esta inhibición fue mucho mayor que la observada con el control positivo, una construcción IL-21R-Fc humana, que, a la concentración más alta utilizada (26,7 nM), no fue capaz de inhibir completamente la proliferación inducida por IL-21 (Ver Figura 2) La IC<sub>50</sub> calculada para Ab327 fue de 1,15 ± 0,25 nM (promedio de 5 experimentos independientes ± DE). El anticuerpo de control negativo (control de isotipo hlgG4) no inhibió la proliferación de células B primarias inducida por IL-21. La Tabla 5 muestra que Ab327 es capaz de neutralizar la proliferación inducida por IL-21 humana de células B humanas primarias in vitro. Los números muestran el porcentaje de proliferación de células B humanas ± SDEV. En conclusión, el Ab327 inhibió la proliferación inducida por IL-21 de células B humanas primarias in vitro.

Tabla 5

IC*	Valores** Isotipo hlgG4	SDEV	Valores** huIL-21 R:Fc	SDEV	Valores** Ab327	SDEV
0	100	-	100	-	100	-
0,1	96	5,34	83	15,8	83	10,4
0,21	115	10,3	99	10,8	96	6,77
0,42	107	17,1	87	6,43	82	7,21
0,83	114	15,3	109	6,33	79	16,2
1,67	108	4,78	90	12,6	25	3,68
3,33	119	18,7	103	13,7	13	2,38
6,67	103	17,9	-	-	6,9	1,59
13,3	-	-	77	13,8	-	-

35

(continuación)

IC*	Valores** Isotipo hIgG4	SDEV	Valores** huIL-21 R:Fc	SDEV	Valores** Ab327	SDEV
13,3	101	6,21	-	-	5,5	1,47
26,7	96	11,2	-	-	4,0	1,34
53,3	-	-	83	6,2	-	-
*concentración de inhibidor (nM)						
** % de cambio de peso para cada tratamiento						

**El Ab327 neutralizó la diferenciación de células plasmáticas inducidas por IL-21 humana de células B humanas primarias in vitro.**

5 La diferenciación de células B en plasmablastos está regulada por la integración de señales proporcionadas por antígeno y células T (interacción CD40-CD40L y producción de citoquinas). Una de las citoquinas importantes para la diferenciación de las células B humanas es la IL-21, que induce la generación de células plasmáticas y la secreción de anticuerpos de las células B ingenuas y de memoria activadas. Se ha mostrado que la IL-21 induce la expresión de CD25 (IL-2R) en las células B activadas, sensibilizando esas células a los efectos promotores de diferenciación de la IL-2, permitiendo así la interacción cooperativa entre IL-2 e IL-21 para amplificar la generación de plasmablastos y la secreción de anticuerpos. El objetivo era determinar si Ab327 podía inhibir la diferenciación inducida por IL-21 de células B humanas primarias en células plasmáticas in vitro.

15 Se obtuvieron capas leucocíticas como se describió anteriormente. Las células B purificadas se cultivaron a 0,75 millones de células/ml (0,15 millones de células/pozo) en placas de cultivo de fondo plano de 96 pozos con estimuladores apropiados (RPMI-1640/FBS al 10 % que contenía piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales, HEPES 10 mM pH 7,0, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) durante 6 días a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células B aisladas se incubaron con una combinación de IL-21 humana 3,33 nM, 1 µg/ml de CD40 antihumano (BD Pharmingen), 100 U/ml de IL-2 humana (Proleukin, Hanna's Pharmaceutical Supply Co.) y/o 26,7 nM Ab327 o 26,7 nM de un anticuerpo IgG4 humano (control negativo). Seis días después del cultivo, las células se lavaron con tampón de tinción (FBS/PBS al 2 %) y se incubaron con anticuerpos específicos para CD38 humano, IgD, CD19, CD27 (todos de BD Biosciences) durante 40 minutos a 4 °C. El análisis por citometría de flujo de cinco colores se realizó utilizando un citómetro de flujo FC-500 (Beckman Coulter). Las células plasmáticas se identificaron como células que expresan altos niveles de CD38 y bajos niveles de IgD (véase la Tabla 6 dada más adelante).

25 Dado que existe una alta variabilidad entre los donantes, los resultados que se muestran a continuación se expresan como un aumento del número relativo de células plasmáticas (células CD38 altas +IgD bajas) inducidas por la adición de IL-21, donde el valor para las células plasmáticas derivado de cada donante en medio + anti-CD40 + IL-2 se establece en igual a uno (1). Los datos se muestran como "aumento de multiplicidad" para los efectos sobre las células B humanas primarias de cinco donantes sanos.

**Tabla 6**

Medio + anti-CD40 + IL-2	Medio + anti-CD40 + IL-2 + IL-21	Medio + anti-CD40 + IL-2 + IL-21 + Isotipo IgG4	Medio + anti-CD40 + IL-2 + IL-21 + Ab327
1	176	174	11,7
1	114	108	3,38
1	47	47	7,81
1	68	66	6,87
1	22	23	3,64

5 Las células B frescas cultivadas con la combinación de anti-CD40 e IL-2 contenían pocas células plasmáticas CD38 altas/IgD bajas. En contraste, la coestimulación de células B purificadas con anti-CD40 e IL-2 en presencia de IL-21 dio como resultado una diferenciación sustancial en células plasmáticas. El anticuerpo de control negativo (Isotipo hlgG4) no pudo inhibir la actividad de IL-21. El Ab327 inhibió la diferenciación de células plasmáticas inducida por IL-21 de las células B humanas primarias (n=5 donantes, p=0,008, Prueba t no apareada Ab327 frente a anticuerpo de isotipo IgG4). En conclusión, el Ab327 inhibió la diferenciación de células plasmáticas inducidas por IL-21 humana in vitro.

Ab327 neutralizó la actividad de IL-21 humana en ratones.

10 La inyección de IL-21 en ratones conduce a una expansión rápida y transitoria de varios tipos de células en el bazo (incluidas las subpoblaciones de células B y T) claramente identificadas usando marcadores específicos. El objetivo de este experimento era investigar si Ab327 podía inhibir la actividad biológica de la IL-21 humana en ratones.

15 Se inyectó intraperitonealmente (ip) a ratones hembra C57B16 de ocho a diez semanas de edad (n=5 por grupo) con Ab327 (1 mg/ratón) o anticuerpo de control de isotipo (hlgG4, 1 mg/ratón) el día 1. En los días 2 y 3 los ratones recibieron ip inyección de 50 µg de IL-21 humana recombinante por ratón por día o PBS. El día 4, se preparó una suspensión celular de células de bazo y se determinó el número total de células después de lisar los glóbulos rojos. El porcentaje relativo de células sensibles a IL-21 se determinó usando los marcadores de superficie celular Gr-1 y Sca-1 por citometría de flujo. El número total de células sensibles a IL-21 por bazo se calculó multiplicando el porcentaje de células sensibles a IL-21 (células Gr-1lowSca-1+) por el número total de células en el bazo.

20 Los resultados dados en la Tabla 7 a continuación se muestran como el número total de células sensibles a IL-21 ( $\times 10^6$ ) en el bazo de cada uno de los cinco ratones.

**Tabla 7**

Número de células de bazo sensibles a hIL-21 ( $\times 10^6$ )		
PBS + Isotipo IgG4	hIL-21 + Isotipo IgG4	hIL-21 + Ab327
1,72	9,12	2,26
1,73	9,19	2,32
2,59	9,23	3,49
2,64	11,78	2,34
2,36	12,27	5,25

25 La inyección de IL-21 humana provocó un aumento de células sensibles a IL-21. La presencia de Ab327 redujo el número de esas células ( $p < 0,0001$ , Prueba t no pareada Ab327 + IL-21 vs. IgG4 + IL-21 e IgG4 + PBS vs. IgG4 + IL-21) en relación con los animales que recibieron un control negativo de anticuerpos. La exposición a Ab327 y anticuerpos de control negativo dentro de cada grupo se confirmó por ELISA cuantitativo. Se concluye que Ab327 neutralizó efectivamente la actividad biológica de la IL-21 humana in vivo.

El Ab327 demostró eficacia en un modelo in vivo de activación de células T humanas en ratones NSG.

30 Se ha mostrado previamente que la neutralización de IL-21 humana previene la progresión de la enfermedad en un modelo de activación de células T humanas en el que las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se injertan en ratones NSG severamente inmunocomprometidos (NOD-scid IL-2R $\gamma$  nulo; Hippen KL, et al. Blocking IL-21 signaling ameliorates xenogeneic GVHD induced by human lymphocytes. Blood 2012; 119: 619). Los ratones NSG carecen de células T, B y NK, y también tienen una función reducida de los macrófagos y las células dendríticas. El trasplante de PBMC humanos da como resultado una activación abierta de células T humanas y su infiltración en la piel, hígado, intestino, pulmones y riñones de ratones. Esto se acompaña de un síndrome de desgaste que finalmente conduce a la muerte (Hippen, 2012). La ventaja de este modelo es que la enfermedad es impulsada por células inmunes humanas y citoquinas humanas, lo que permite la interrogación in vivo de anticuerpos que carecen de reactividad cruzada con otras especies. El propósito de este estudio fue demostrar la eficacia in vivo y la actividad modificadora de la enfermedad de Ab327 en el modelo de activación de células T humanas cuando se administra en

40

modo de prevención (administrado comenzando en el momento del injerto) o en modo de tratamiento (administrado comenzando a los 21 días después del injerto)

5 Antes del injerto, los ratones hembra NSG se dividieron en grupos con base en las mediciones de línea base del peso corporal (n=10/grupo). El día 0, los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con 10<sup>7</sup> PBMC humanas aisladas de una capa leucocitaria adquirida del banco de sangre de San Diego. Para el modo de prevención (Figura 3), los ratones se dosificaron por vía subcutánea con 1 o 10 mg/kg de Ab327 o 10 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo hlgG4 al momento del injerto y una vez por semana a partir de entonces. Se midió el peso corporal y se monitorizó el aspecto general y la salud 2-3 veces por semana. El día 19, se obtuvo sangre por corte en la cola y se analizó el injerto de células CD45+ humanas mediante citometría de flujo. Para el modo de tratamiento (Figura 4), los animales que no recibieron ningún tratamiento fueron reasignados en grupos de cohortes emparejados en función de los datos de citometría de flujo y el peso corporal. El día 21 después del injerto, los ratones se dosificaron por vía subcutánea con 10 mg/kg de Ab327 o 10 mg/kg de anticuerpo de control de isotipo hlgG4, y luego una vez por semana a partir de entonces. Cuatro ratones no injertados se incluyeron como "controles no tratados o ratones no injertados". El cambio de peso corporal se calculó como un porcentaje del peso de línea base (día (x) peso/día 0 peso \* 100). Los resultados se muestran como porcentaje de cambio de peso corporal desde la línea base con el tiempo.

10 Para el modo de prevención, los ratones tratados con un anticuerpo de control de isotipo humano (véase la Figura 3, cuadrados abiertos) desarrollaron un fenotipo de desgaste tan pronto como 20 días después de la transferencia celular. En el día 45 posterior a la transferencia, la pérdida de peso promedio en el grupo de control de isotipo fue mayor al 10 % desde la línea base y la mayoría de los ratones estaban en peligro, por lo que el estudio se terminó. El tratamiento con 10 mg/kg/semana de Ab327 (Figura 3, cuadrados cerrados) iniciado el día del injerto (modo de prevención) abolió por completo el fenotipo de desgaste. Los ratones continuaron ganando peso comparable a los ratones no injertados. Sus pesos fueron significativamente diferentes estadísticamente del grupo de control de isotipo (p=0,000846 y p<0,001 Ab327 versus isotipo y ratones no injertados versus isotipo respectivamente, ANOVA de 2 vías, medidas repetidas). La dosis de 1 mg/kg/semana de Ab327 (Figura 3, triángulos cerrados) tuvo un efecto parcial, ya que pareció ralentizar la progresión de la pérdida de peso. Sin embargo, los pesos de los ratones en este grupo no fueron estadísticamente diferentes del control de isotipo. La Tabla 8 muestra el porcentaje promedio ±SDEV del cambio de peso corporal desde el inicio en ratones NSG severamente inmunocomprometidos (NOD-scid IL-2Ry nulo) injertados con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) tratadas con anticuerpo para IL-21 o anticuerpo de control de isotipo para 45 días. El tratamiento comenzó al mismo tiempo que el injerto de PBMC. Hay una diferencia significativa entre el grupo Ab327 10 mg/kg y el grupo de control de isotipo.

Tabla 8

Días***	Valores* sin injerto	SDEV	Valores*-isotipo 10 mg/kg	SDEV	Valores*-Ab 327 10 mg/kg	SDEV	Valores*-Ab 327 1 mg/kg	SDEV
0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
7	100,9	3,0	102,7	2,9	103,1	3,1	102,5	2,7
14	103,8	2,8	105,8	5,0	107,4	4,6	106,2	3,4
17	104,4	1,9	108,0	4,8	109,5	2,6	107,5	4,0
21	106,5	2,7	104,8	5,8	107,4	3,9	108,2	5,1
24	110,8	6,1	103,1	8,8	107,4	3,9	109,5	6,6
26	110,1	4,1	100,8	10,4	108,5	3,6	109,6	7,3
28	110,4	2,8	99,6	13,5	111,7	3,9	109,2	9,8
31	110,2	3,7	98,2	14,2	111,3	4,1	107,7	10,4
33	111,2	3,2	95,4	12,5	113,4	3,6	105,5	11,9

(continuación)

Días***	Valores* sin injerto	SDEV	Valores*-isotipo 10 mg/kg	SDEV	Valores*-Ab 327 10 mg/kg	SDEV	Valores*-Ab 327 1 mg/kg	SDEV
35	109,9	2,5	93,6	11,5	113,9	4,3	102,2	13,4
38	109,5	4,3	91,9	11,3	114,2	5,5	99,5	15,0
40	110,3	2,9	90,9	11,1	113,2	4,4	98,8	17,2
42	111,4	4,0	89,9	11,1	115,1	5,4	97,5	18,1
45	114,0	3,3	89,6	10,9	116,1	4,5	97,3	18,1

\*\* % de cambio de peso para cada tratamiento

\*\*\* días después del injerto

5 Como se indicó anteriormente, la administración de PBMC humanas dio como resultado una enfermedad degenerativa que comenzó aproximadamente 20 días después del injerto. Para investigar si el bloqueo de la IL-21 humana fue capaz de detener el deterioro de la enfermedad en curso (modo de tratamiento), los ratones fueron tratados con 10 mg/kg/semana de control de isotipo Ab327 o hlgG4 a partir del día 21 después del injerto. Como se muestra en la Figura 4, los ratones a los que se les administró el anticuerpo de control de isotipo IgG4 humano (cuadrados abiertos) continúan perdiendo peso. Por otro lado, el tratamiento con Ab327, iniciado después del inicio de la enfermedad (21 días después del injerto, Figura 4, cuadrados cerrados), fue eficaz para atenuar el fenotipo de desgaste. El peso promedio en este grupo fue significativamente diferente estadísticamente del grupo de control de isotipo ( $p=0,042$ , ANOVA de 2 vías, medidas repetidas). La diferencia en la pérdida de peso y la gravedad de la enfermedad no se debió a diferencias en el injerto de células humanas en los ratones. Los números de células CD45+ humanas periféricas, así como las células humanas en el bazo al final del estudio, fueron ligeramente superiores en los ratones tratados con Ab327 en comparación con los animales tratados con control de isotipo. En resumen, Ab327 demostró eficacia y actividad modificadora de la enfermedad en un modelo xenogénico de activación de células T in vivo. La Tabla 9 muestra el porcentaje promedio  $\pm$ SDEV del cambio de peso corporal desde el día 21 en ratones NSG severamente inmunocomprometidos (IL-2Ry NOD-scid nulo) injertados con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) tratadas con anticuerpo para IL-21 o control de isotipo de anticuerpo. El tratamiento comenzó en el día 21. Hay una diferencia significativa entre el grupo Ab327 de 10 mg/kg y el grupo de control de isotipo.

20

Tabla 9

Días***	Valores** sin injerto	SDEV	Valores **-isotipo 10 mg/kg	SDEV	Valores **-Ab327 10mg/kg	SDEV
21	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
24	104,0	4,7	98,2	4,1	100,8	3,5
26	103,4	1,8	96,0	6,5	102,1	4,1
28	103,7	3,0	94,8	9,7	103,7	5,3
31	103,5	2,9	93,5	10,8	101,9	4,8
33	104,3	1,3	90,8	8,9	101,9	5,8

(continuación)

Días***	Valores**sin injerto	SDEV	Valores **-isotipo 10 mg/kg	SDEV	Valores **-Ab327 10mg/kg	SDEV
35	103,2	1,2	89,1	8,0	98,9	7,1
38	102,8	3,8	87,6	8,0	99,0	6,7
40	103,5	2,0	86,6	8,0	97,8	6,8
42	104,6	1,8	85,7	8,1	96,5	7,4
45	107,0	1,7	85,3	8,0	96,2	8,0
** % de cambio de peso para cada tratamiento						
*** días después del injerto						

#### Farmacocinética de Ab327

5 La farmacocinética de Ab327 se caracterizó después de una dosis única intravenosa o subcutánea de 3 mg/kg en monos cynomolgus macho. Se recogieron muestras de suero hasta 1008 horas después de la dosis (6 semanas). Los perfiles de tiempo de concentración se generaron después de cuantificar el anticuerpo usando dos procedimientos ELISA (IgG humana total o captura de antígeno). El procedimiento de IgG humana total utiliza un formato ELISA para medir la concentración de anticuerpo anti-IL-21. Los patrones, controles y muestras de prueba se incubaron con AffiniPure F(ab)<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG (recubrimiento Ab) que se había inmovilizado en una placa de microtitulación. Después de la incubación, se añadió a los pozos una IgG4-HRP antihumana de ratón (peroxidasa de rábano picante). Una vez que la enzima no unida se lavó, se añadió solución de sustrato SureBlue<sup>®</sup> TMB (tetrametilbencidina) a los pozos. El desarrollo del color se detuvo mediante la adición de una solución ácida y la densidad óptica se midió a 450 nm con la corrección de longitud de onda establecida en 650 nm.

15 El procedimiento de captura de antígeno utiliza un formato ELISA para medir la concentración de anticuerpo anti-IL-21. Los estándares, los controles y las muestras de prueba se incubaron con IL-21-biotina humana que se había inmovilizado en una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina. Después de la incubación, se añadió a los pozos una IgG4-HRP antihumana de ratón (peroxidasa de rábano picante). Una vez que la enzima no unida se lavó, se añadió solución de sustrato SureBlue<sup>®</sup> TMB (tetrametilbencidina) a los pozos. El desarrollo del color se detuvo mediante la adición de una solución ácida y la densidad óptica se midió a 450 nm con la corrección de longitud de onda establecida en 650 nm. El rango de ensayo fue de 5-500 ng/ml.

20 Los resultados farmacocinéticos (medias) se proporcionan a continuación en la Tabla 10 y la Tabla 11. El número de animales en cada grupo fue 2.

**Tabla 10**

Valores de administración IV						
Ensayo	t <sub>1/2</sub> *	AUC <sub>0-t</sub>	AUC <sub>0-INF</sub>	AUC % Extrap	CLss	Vss
	(h)	(h*µg/mL)	(h*µg/mL)	(%)	(mL/h/kg)	(mL/kg)
Captura	249	6200	6750	7,36	0,430	47,2
Total	105	6170	6220	0,823	0,484	52,0

Abreviaturas =  $t_{1/2}$  - vida media, AUC<sub>0-t</sub> - área bajo la curva desde 0 hasta la última concentración medible, AUC<sub>0-inf</sub> - área bajo la curva desde 0 hasta el infinito, AUC % extrapolado - Porcentaje de AUC<sub>0-inf</sub> debido a la extrapolación desde la última concentración medible hasta el infinito, CL<sub>ss</sub>: estimación de la eliminación corporal total, V<sub>ss</sub>: estimación del volumen de distribución en estado estacionario. \*Las vidas medias terminales se calcularon entre 72-168 horas.

5

Tabla 11

Valores de administración subcutánea								
Ensayo	$t_{1/2}$ *	Tmax	Cmax	AUC <sub>0-t</sub>	AUC <sub>0-INF</sub>	AUC % Extrap	CL <sub>ss</sub> /F	F %
	(h)			(h·µg/mL)	(h·µg/mL)	( %)	(mL/h/kg)	(mL/kg)
Captura	51,8	60	21,6	4410	4540	2,45	0,683	72
Total	53,6	84	24,0	4620	4620	0,0276	0,675	74

Abreviaturas =  $t_{1/2}$  - vida media, Tmax - tiempo a concentración máxima, Cmax - concentración máxima, AUC<sub>0-t</sub> - área bajo la curva de 0 a la última concentración medible, AUC<sub>0-inf</sub> - área bajo la curva de 0 al infinito, AUC % extrapolado - porcentaje de AUC<sub>0-INF</sub> debido a la extrapolación desde la última concentración medible hasta el infinito, CL<sub>ss</sub>/F - eliminación/biodisponibilidad, F % - biodisponibilidad utilizando una media de 3 mg/kg i.v. dosis como referencia =  $(AUC_{0-inf} \text{ s.c.} / AUC_{0-inf} \text{ i.v.}) / (Dosis\text{-iv} / Dosis\text{-s.c.}) \cdot 100$ . \*Las vidas medias terminales se calcularon entre 96-336 horas.

10

Después de una única administración intravenosa o subcutánea de Ab327 a monos cynomolgus macho, los perfiles de concentración-tiempo sugirieron la formación de anticuerpos anti-fármaco (ADA) y se confirmó ADA en 4/4 monos. La vida media terminal promedio fue de 105-249 horas y se calculó a partir de la pendiente entre 72-168 horas para evitar un impacto significativo de ADA. La eliminación media fue de 0,43-0,48 ml/h/kg, que se encuentra justo fuera de un rango típico de eliminación de anticuerpos monoclonales de 0,2-0,4 ml/h/kg.

15

Después de la administración subcutánea, la biodisponibilidad fue del 72-74 %, que se encuentra en el rango típico para un anticuerpo monoclonal (50-100 %). A pesar de la formación de ADA, la farmacocinética de Ab327 en monos fue relativamente similar a la esperada para un anticuerpo monoclonal que se une a un ligando soluble con una eliminación ligeramente superior a la normal.

20

Con base en estos estudios, se concluye que el Ab327 tendrá farmacocinética en humanos dentro del rango esperado para un anticuerpo IgG4 humanizado. La eliminación en humanos proyectada es de 0,3 ml/h/kg (0,02 L/h en un humano de 70 kg) con base en la escala alométrica de la eliminación en monos y se proyecta que la biodisponibilidad sea del 50-75 % en humanos.

25

#### **El tratamiento con anticuerpo anti-ratón IL-21 alivió la infiltración linfocítica en las glándulas salivales de ratones NOD.**

Puesto que el Ab327 no neutraliza la IL-21 de roedores, se desarrolló una molécula sustituta para su uso en modelos de enfermedad preclínica. El anticuerpo Ab728 es un anticuerpo monoclonal IgG1 murino que se une específicamente a la IL-21 de ratón. La afinidad de unión de IL-21 murina a Ab728 es 1 pM. El Ab728 fue capaz de neutralizar completamente la IL-21 murina en ensayos in vivo e in vitro.

30

El ratón diabético no obeso (NOD) se usa ampliamente como modelo del Síndrome de Sjögren porque desarrolla espontáneamente infiltración linfocítica en las glándulas salivales. El trabajo previo mostró que la supresión local de los niveles de IL-21 en las glándulas submandibulares de ratones NOD con lentivirus de shARN IL-21 podría retrasar el desarrollo de síntomas similares al Síndrome de Sjögren (Liu H, et al. Local suppression of IL-21 in submandibular glands retards the development of Sjögren's syndrome in non-obese diabetic mice. J Oral Pathol Med 2012; 41: 728). El objetivo de este experimento era investigar si la administración sistémica de Ab728, un sustituto de Ab327, pudo prevenir o atenuar el desarrollo del Síndrome de Sjögren en ratones NOD.

35

Se trataron ratones hembra NOD con Ab728 o con el control de isotipo mIgG1 (20 mg/kg/semana) a partir de las 7 semanas de edad. Los ratones se sacrificaron a las 18 semanas de edad y se recogieron las glándulas salivales. Se fijó un trozo de glándula salival con PFA al 1,6 % y sacarosa al 20 % a 4 °C durante la noche, se embebió en OCT y se almacenó a -80 °C hasta el análisis por inmunofluorescencia. Otra pieza se congeló en nitrógeno líquido para estudios de ARNm.

40

En ratones NOD, la inflamación focal en las glándulas salivales submandibulares y las glándulas lagrimales se desarrolla desde aproximadamente las 8 semanas de edad en adelante. Los focos parecen comparables en estructura y composición celular con infiltrados que se encuentran en algunas glándulas salivales humanas, con presencia de células T y B. Para investigar si el tratamiento anti-IL-21 aliviaba la infiltración linfocítica en la glándula salival NOD, se realizó una tinción para inmunofluorescencia. En resumen, se lavaron secciones congeladas de 8 µm de glándulas salivales con PBS y luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos primarios purificados, seguido de incubación con los anticuerpos secundarios marcados apropiados durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios fueron anti-CD3 (células T) y anti-B220 (células B) de BD Biosciences. Los anticuerpos secundarios fueron Alexa Fluor 488 de cabra anti-rata IgG y DyLight 594 de cabra anti-hámster armenio de Jackson ImmunoResearch Laboratories. Se utilizó DAPI para identificar el núcleo de las células.

Los ratones NOD tratados con anticuerpo de control mIgG1 mostraron la presencia de infiltrados linfomonocíticos típicos dispuestos como agregados periductales con linfocitos T y B (Figura 6) altamente organizados que se asemejan a focos linfocíticos encontrados en pacientes con síndrome de Sjögren. El tratamiento con Ab728 hizo disminuir eficazmente no solo el número sino también el tamaño de los focos observados.

Se cree que el desarrollo de agregados linfoides en el síndrome de Sjögren está regulado por la producción ectópica de la quimioquina linfoide CXCL13 y su receptor afín CXCR5, que regulan la recirculación y el posicionamiento de las células B y las células foliculares T CD4+ (TFH) en las estructuras del centro germinal. Se ha demostrado que IL-21 está involucrada en el mantenimiento de TFH y las estructuras del centro germinal. La IL-21 también controla la activación de los linfocitos T CD8+, que se cree que destruyen las células diana a través de perforina y Granzimas. Para investigar si el tratamiento anti-IL-21 disminuiría la expresión de esos marcadores, se aisló el ARN total de las glándulas salivales congeladas por homogeneización en Trizol seguido por el kit RNeasy Mini (Qiagen, Inc.). Las concentraciones de ARN se determinaron a partir de la absorción espectrofotométrica a 260 nm. El ARN se transcribió inversamente en ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (PE Applied Biosystems). Todas las reacciones se realizaron por triplicado para determinar la abundancia relativa de ARNm analizados. Los conjuntos de sondas de cebador para IL-21 (Mm00517640\_m1), CXCR5 (Mm00432086\_m1), CXCL13 (Mm04214185\_s1), CCR9 (Mm02620030\_s1), Granzima B (Mm00442834\_m1) y CD8 (MmOl\_182107\_g1 se obtuvieron de PE1). GusB (Mm00446956\_m1) se midió como controles endógenos para normalizar la variabilidad en los niveles de expresión génica. Los datos de expresión se analizaron utilizando el procedimiento Delta Ct. Los valores individuales de Ct se calcularon como medias de mediciones por triplicado.

Las transcripciones de ARNm de CXCL13, CXCR5, IL-21, CD8 y Granzima B fueron reguladas negativamente de forma estadísticamente significativa en ratones tratados con Ab728, en comparación con ratones tratados con anticuerpo de control mIgG1. La Figura 5 muestra el análisis de ARNm en glándulas salivales de ratones. Se puede ver que el tratamiento modula la expresión de proteínas involucradas en la enfermedad. En resumen, la administración de un anticuerpo anti-IL-21 de ratón (Ab728) hizo disminuir la infiltración linfocítica en las glándulas salivales y retrasó el desarrollo de síntomas similares a SS de ratones NOD.

#### **El tratamiento anti-mIL-21 (Ab728) previene la diabetes en ratones NOD.**

El Ab728 es un anticuerpo monoclonal IgG1 murino que se une específicamente a la IL-21 de ratón. La afinidad de unión de la IL-21 murina para sustituir a Ab728 es de 1 pM. El Ab728 fue capaz de neutralizar completamente la IL-21 murina en ensayos in vivo e in vitro.

La diabetes humana tipo I es una enfermedad autoinmune que resulta de la destrucción autorreactiva de las células beta productoras de insulina en los islotes de Langerhans del páncreas, lo que conduce a la consiguiente pérdida de producción de insulina. La cepa de ratones diabéticos no obesos (NOD) desarrolla una enfermedad similar y también sirve como un sistema modelo para estudiar los mecanismos involucrados en el inicio y la propagación de la respuesta autoinmune. Los estudios histológicos han demostrado que se observan pocos infiltrados de células inmunes en los islotes hasta aproximadamente las 3 a 4 semanas de edad, cuando los ratones macho y hembra comienzan a demostrar infiltrados mononucleares que rodean el islote (periinsulitis). Estos infiltrados progresan e invaden los islotes (insulitis) seguidos de hiperglucemia y diabetes completamente desarrollada que comienzan aproximadamente a las 12 semanas de edad.

El trabajo previo mostró que la eliminación de la señalización de IL-21 en ratones NOD conduce a la abrogación casi completa del desarrollo de la enfermedad (Spolski R, et al. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 14028, 2008). El propósito del experimento era investigar si la administración sistémica de Ab728 era capaz de prevenir o atenuar el desarrollo de diabetes en ratones NOD.

Se trataron ratones hembra NOD con Ab728 o con el control de isotipo mIgG1 (20 mg/kg/semana) en diferentes períodos de tiempo en el procedimiento de la enfermedad. Un grupo de ratones comenzó el tratamiento a las 7 semanas de edad (estudio de prevención, Figura 7A) y otro grupo de animales comenzó el tratamiento a las 13 semanas de edad (etapa preclínica tardía, Figura 7B). En ambas situaciones, los ratones fueron seguidos en cuanto el desarrollo de diabetes hasta que los ratones tuvieron 37 semanas de edad. Para seguir el desarrollo de la diabetes, los niveles de glucosa en sangre se monitorizaron semanalmente y los animales se consideraron diabéticos si la

glucosa en sangre estaba por encima de 250 mg/dl en dos mediciones consecutivas. La exposición a Ab728 se confirmó por ELISA cuantitativo.

5 Los ratones NOD tratados con el anticuerpo de control mIgG1 comenzaron a desarrollar diabetes cuando tenían entre 13 y 15 semanas de edad y el 75 % de los ratones progresaron a diabetes manifiesta a las 37 semanas (9 de 12 ratones para prevención y 6 de 8 ratones para la etapa preclínica tardía -véase Figura 7A y Figura 7B). En contraste, el tratamiento anti-IL-21 retrasó significativamente la progresión de la diabetes. Solo uno de cada 12 ratones (8 %, Figura 7A, p=0,0007) desarrolló diabetes cuando el tratamiento comenzó a las 7 semanas de edad y solo uno de cada once ratones (9 %, Figura 7B, p=0,002) progresó a diabetes manifiesta cuando el tratamiento comenzó durante la etapa preclínica tardía.

10 En resumen, la administración de un anticuerpo anti-IL-21 de ratón (Ab728) evitó eficazmente el desarrollo de diabetes en ratones NOD.

**Secuencias**

**Secuencias de aminoácidos de Ab327**

SEQ ID NO:	Identidad	Longitud	Secuencia
1	Dominio variable de cadena pesada	117	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGY TFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGLIDTS DVYTIYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCARYGPLAMDYWGQ GTLTVSS
2	Dominio variable de cadena liviana	106	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIS NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQFHTLRITFGGGTKVEIK
3	Cadena pesada	443	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGY TFTDYWMHWVRQAPGQGLEWMGLIDTS DVYTIYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCARYGPLAMDYWGQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDL DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGL
4	Cadena liviana	213	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIS NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQFHTLRITFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

(continuación)

SEQ ID NO:	Identidad	Longitud	Secuencia
7	LC -CDR1	11	RASQDISNYLN
8	LC-CDR2	8	YYTSRLHS
9	LC-CDR3	8	QQFHTLRT
10	HC-CDR1	13	KASGYTFTDYWMH
11	HC-CDR2	17	LIDTSDVYTIYNQKFKG
12	HC-CDR3	10	ARYGPLAMDY

Las siguientes secuencias fueron usadas en el Ejemplo y los Ensayos.

**IL-21 HUMANA** - Entrada de la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot #Q9HBE4

5 QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLK  
SANTGNNERIINVSIIKLRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFK  
SLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:13)

**IL-21 CYNO** - La secuencia fue clonada internamente no disponible en la base de datos pública

QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLDPEFLPAPEDVETNCEWSAISCFQKAQLKS  
ANTGNNERIINLSIKLRKSPSTGAERRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSL  
LQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:14)

**IL-21 RATÓN** - Entrada de la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot #Q9ES17

HKSSPQGPDRLLIRLRHLIDIVEQLKIYENDLDPELLSAPQDVKGHCHEAFAFCFQ  
KAKLKPSNPGNNKTFIIDLVAQLRRRLPARRGGKKQKHIKCPSCDSYEK RTPKE  
FLERLKWLLQKMIHQHLS (SEQ ID NO:15)

10 **IL-21 RATA** - Entrada de la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot #A3QPB9

HKSSPQRDPDHLIRLRHLMIDIVEQLKIYENDLDPELLTAPQDVKGQCEHEAFACF  
QKAKLKPSNTGNKTFINDLLAQLRRRLPAKRTGNKQRHMAKCPSCDLYEKKTP  
KEFLERLKWLLQKMIHQHLS (SEQ ID NO:16)

IL-21 CONEJO - (REACTIVO COMERCIAL - R&D Systems, cat#7274-RB/CF)

HKSSSKGQDRYMIRMHQLLDIVDQLQSDVNDLDPDFLPAPQDVQKGCEQSAFSC  
FQKAQLKPANAGDNGKRISLIKQLKRKLPSTKSKKTQKHRPTCPSCYSYEKKNL  
KEFLERLKSIIQKMIHQHLLHLR (SEQ ID NO:17)

**ADN para expresión de Ab327**

15

SEQ ID NO:	Identidad	Longitud	Secuencia
5	Cadena pesada		caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcag tgaaggttctgcaaggcatctggctacacattcactgactactggatgcac tgggtgcgacaggcccctggacaagggcttgagtggatgggactgattgata cttctgatgtttatactatctacaatcaaaagttcaagggcagagtcacatgac cagggacacgtccacgagcacagtctacatggagctgagcagcctgagatc gaggacacggccgtgtattactgtgcaagatatgggcccctggctatggacta ctggggccagggcaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccc atcggcttcccgtagecgcctgtccaggagcacctccgagagcacagcc gccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctgt ggaactcaggegccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgctctaca gtccctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaaacca aggtggacaagagagttgagtcctcaaatatgggtccccatgcccacctgccc agcacctgaggccgccgggggaccatcagttctctgttcccccaaaacc aaggacactctcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgctggtggtgg acgtgagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgt ggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaacagca cgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacgg caaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgtctccatcgag aaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacc ctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgc ctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgaggaaagcaatg ggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacg gctccttctctctacagcaggtaaccgtggacaagagcaggtggcagga ggggaatgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccactacac acagaagagcctctccctgtctctgggt

(continuación)

SEQ ID NO:	Identidad	Longitud	Secuencia
6	Cadena liviana		gacatccagatgaccagctcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacaga gtcaccatcactgcagggcaagtcaggacattagcaattatttaaactggatc agcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctattacacatcaagatta cactcaggggtcccatcaaggttcagtgccagtgatctgggacagattcac ttcaccatcagcagctcgaacctgaagatttgcaactactactgtcaacagt ttcacacgcttcggacgttcggcggaggaccaaaggtggagatcaaaagaa ctgtggcggcgccatctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatc cggaaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctatccagagaggcaa agtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccaggagagt gtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacct gacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagt cacccatcagggcctgagctcggccgtcacaagagcttaacaggggaga gtgc

**Listado de secuencias**

- <110> Eli Lilly and Company
- 5 <120> ANTICUERPOS PARA IL-21
- <130> X20141
- <150> 61/968550
- <151> 2014-03-21
- <160> 17
- 10 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <223> constructo sintético
- <400> 1

ES 2 774 422 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 Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

Gly Leu Ile Asp Thr Ser Asp Val Tyr Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 2

ES 2 774 422 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 Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Phe His Thr Leu Arg Thr  
 85 90 95

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

<210> 3

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 3

ES 2 774 422 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 Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

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

Gly Leu Ile Asp Thr Ser Asp Val Tyr Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys



ES 2 774 422 T3

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440

<210> 4

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 4

ES 2 774 422 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 Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Phe His Thr Leu Arg Thr  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 5

<211> 1329

5 <212> ADN

ES 2 774 422 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 5

	caggtgcagc	tgggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtt	60
	tcctgcaag	catctggcta	cacattcact	gactactgga	tgcactgggt	gcgacaggcc	120
	cctggacaag	ggcttgagt	gatgggactg	attgatactt	ctgatgttta	tactatctac	180
	aatcaaaa	gttcaagggcag	agtcaccatg	accagggaca	cgtccacgag	cacagtctac	240
	atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	aagatatggg	300
	cccctggcta	tggactactg	gggccagggc	accctgggtca	ccgtctcctc	agcctccacc	360
	aagggcccat	cggtcttccc	gctagcgccc	tgctccagga	gcacctccga	gagcacagcc	420
	gccctgggct	gcctggtcaa	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacgggtgc	gtggaactca	480
	ggcgccctga	ccagcggcgt	gcacaccttc	ccggctgtcc	tacagtcctc	aggactctac	540
	tccctcagca	gcgtggtgac	cgtgccctcc	agcagcttgg	gcacgaagac	ctacacctgc	600
	aacgtagatc	acaagcccag	caacaccaag	gtggacaaga	gagttgagtc	caaatatggt	660
5	cccccatgcc	cacctgccc	agcacctgag	gccgcccggg	gaccatcagt	cttcctgttc	720
	cccccaaac	ccaaggacac	tctcatgatc	tcccggacct	ctgaggtcac	gtgctgtgtg	780
	gtggacgtga	gccaggaaga	ccccgaggtc	cagttcaact	ggtacgtgga	tggcgtggag	840
	gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcccggg	gagcagttca	acagcacgta	ccgtgtggtc	900
	agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaacggca	aggagtacaa	gtgcaaggtc	960
	tccaacaaa	gacctccgct	ctccatcgag	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	1020
	cgagagccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccaggagg	agatgaccaa	gaaccaggtc	1080
	agcctgacct	gcctggtcaa	aggcttctac	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggaaagc	1140
	aatgggcagc	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctccc	tgctggactc	cgacggctcc	1200
	ttcttctct	acagcaggct	aaccgtggac	aagagcaggt	ggcaggagg	gaatgtcttc	1260
	tcatgctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cacagaagag	cctctccctg	1320
	tctctgggt						1329

<210> 6

<211> 639

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

ES 2 774 422 T3

<400> 6

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgca gggcaagtca ggacattagc aattatthaa actgggatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattac acatcaagat tacactcagg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag tttcacacgc ttoggacgtt cggcggaggg 300  
 accaaggtgg agatcaaaaag aactgtggcg gcgccatctg tottcatctt cccgccatct 360  
 gatgagcagt tgaaatccgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420  
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480  
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540  
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 600  
 agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgc 639

<210> 7

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético

<400> 7

10 **Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn**  
 1 5 10

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> constructo sintético

<400> 8

**Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser**  
 1 5

<210> 9

20 <211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético  
 <400> 9  
**Gln Gln Phe His Thr Leu Arg Thr**  
**1 5**  
 <210> 10  
 5 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético  
 10 <400> 10  
**Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Met His**  
**1 5 10**  
 <210> 11  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético  
 <400> 11  
**Leu Ile Asp Thr Ser Asp Val Tyr Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly**  
**1 5 10 15**  
 20 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> constructo sintético  
 <400> 12  
**Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Ala Met Asp Tyr**  
**1 5 10**  
 <210> 13  
 <211> 131  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Esta proteína se produjo de forma recombinante y es idéntica a la secuencia del Homo sapiens.  
 <400> 13

ES 2 774 422 T3

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala  
 20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe  
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile  
 50 55 60

Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn  
 65 70 75 80

Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser  
 85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu  
 100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser  
 115 120 125

Glu Asp Ser  
 130

<210> 14

<211> 131

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Esta proteína se produjo de forma recombinante y es idéntica a la secuencia del mono Cynomolgus.

<400> 14

ES 2 774 422 T3

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp  
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Asp Pro Glu Phe Leu Pro Ala  
 20 25 30

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Ile Ser Cys Phe  
 35 40 45

Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile  
 50 55 60

Ile Asn Leu Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Ser Pro Ser Thr Gly  
 65 70 75 80

Ala Glu Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser  
 85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu  
 100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser  
 115 120 125

Glu Asp Ser  
 130

<210> 15

<211> 129

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Esta proteína se produjo de forma recombinante y es idéntica a la secuencia del Mus musculus.

<400> 15

ES 2 774 422 T3

His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg  
 1 5 10 15  
 His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu  
 20 25 30  
  
 Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu  
 35 40 45  
  
 His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn  
 50 55 60  
  
 Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg  
 65 70 75 80  
  
 Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala  
 85 90 95  
  
 Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe  
 100 105 110  
  
 Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu  
 115 120 125

**Ser**

<210> 16

<211> 129

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Esta proteína se produjo de forma recombinante y es idéntica a la secuencia Rattus norvegicus.

<400> 16

ES 2 774 422 T3

His Lys Ser Ser Pro Gln Arg Pro Asp His Leu Leu Ile Arg Leu Arg  
 1 5 10 15

His Leu Met Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu  
 20 25 30

Asp Pro Glu Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly Gln Cys Glu  
 35 40 45

His Glu Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn  
 50 55 60

Thr Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Asn Asp Leu Leu Ala Gln Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Arg Arg Leu Pro Ala Lys Arg Thr Gly Asn Lys Gln Arg His Met Ala  
 85 90 95

Lys Cys Pro Ser Cys Asp Leu Tyr Glu Lys Lys Thr Pro Lys Glu Phe  
 100 105 110

Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu  
 115 120 125

**Ser**

<210> 17

<211> 133

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Esta proteína se produjo de forma recombinante y es idéntica a la secuencia de *Oryctolagus cuniculus*.

<400> 17

ES 2 774 422 T3

His Lys Ser Ser Ser Lys Gly Gln Asp Arg Tyr Met Ile Arg Met His  
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Asp Ile Val Asp Gln Leu Gln Ser Asp Val Asn Asp Leu  
 20 25 30

Asp Pro Asp Phe Leu Pro Ala Pro Gln Asp Val Gln Lys Gly Cys Glu  
 35 40 45

Gln Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Pro Ala Asn  
 50 55 60

Ala Gly Asp Asn Gly Lys Arg Ile Ser Ser Leu Ile Lys Gln Leu Lys  
 65 70 75 80

Arg Lys Leu Pro Ser Thr Lys Ser Lys Lys Thr Gln Lys His Arg Pro  
 85 90 95

Thr Cys Pro Ser Cys Tyr Ser Tyr Glu Lys Lys Asn Leu Lys Glu Phe  
 100 105 110

Leu Glu Arg Leu Lys Ser Leu Ile Gln Lys Met Ile His Gln His Leu  
 115 120 125

Leu Glu His Leu Arg  
 130

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une a la IL-21 humana que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena liviana (LCVR), en el que la LCVR comprende SEQ ID NO: 7 en CDRL1, SEQ ID NO: 8 en CDRL2 y SEQ ID NO: 9 en CDRL3 y en el que la HCVR comprende SEQ ID NO: 10 en CDRH1, SEQ ID NO: 11 en CDRH2 y SEQ ID NO: 12 en CDRH3, en el que la cadena pesada comprende una HCVR que tiene la SEQ ID NO: 1 y en el que la cadena liviana comprende una LCVR que tiene el SEQ.ID.NO: 2.
- 10 2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste en dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas livianas de anticuerpo, en las que cada cadena pesada comprende un dominio variable de cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 1, y en cada cadena liviana comprende un dominio variable de cadena liviana, cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de la SEQ ID NO: 2.
3. El anticuerpo de acuerdo la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la secuencia de aminoácidos de cada cadena pesada es la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de cada cadena liviana es la secuencia de la SEQ ID NO: 4.
- 15 4. Una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 3 y que comprende un polinucleótido que codifica la cadena liviana del anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 4 .
5. La molécula de ADN de la reivindicación 4, en la que la secuencia del polinucleótido que codifica la cadena pesada del anticuerpo es la secuencia de la SEQ ID NO: 5 y en la que la secuencia del polinucleótido que codifica la cadena liviana del anticuerpo es la secuencia de la SEQ ID NO: 6.
- 20 6. Una célula de mamífero transformada con la molécula de ADN de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, cuya célula de mamífero transformada es capaz de expresar un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas livianas de inmunoglobulina, en las que la secuencia de aminoácidos de cada una de las dos cadenas pesadas es la secuencia de SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de cada una de las dos cadenas livianas es la secuencia de SEQ ID NO: 4.
- 25 7. Un procedimiento de producción de un anticuerpo, cuyo anticuerpo comprende dos cadenas pesadas de anticuerpo y dos cadenas livianas de inmunoglobulina, en el que la secuencia de aminoácidos de cada una de las dos cadenas pesadas es la secuencia de la SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos de cada de las dos cadenas livianas es la secuencia de SEQ ID NO: 4, y cuyo procedimiento comprende:
  - a. cultivar la célula de mamífero de la reivindicación 6 en condiciones tales que se exprese el anticuerpo, y
  - 30 b. recuperar el anticuerpo expresado.
8. Un anticuerpo obtenible por el procedimiento de la reivindicación 7.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 u 8 para su uso en terapia.
10. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la terapia es el tratamiento de una afección autoinmune.
- 35 11. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la terapia es el tratamiento del Síndrome de Sjögren primario, el Síndrome de Sjögren, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Grave o la diabetes tipo 1.
12. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la terapia es el tratamiento del Síndrome de Sjögren primario o el Síndrome de Sjögren.
- 40 13. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la terapia es el tratamiento del lupus eritematoso sistémico.
14. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 u 8 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

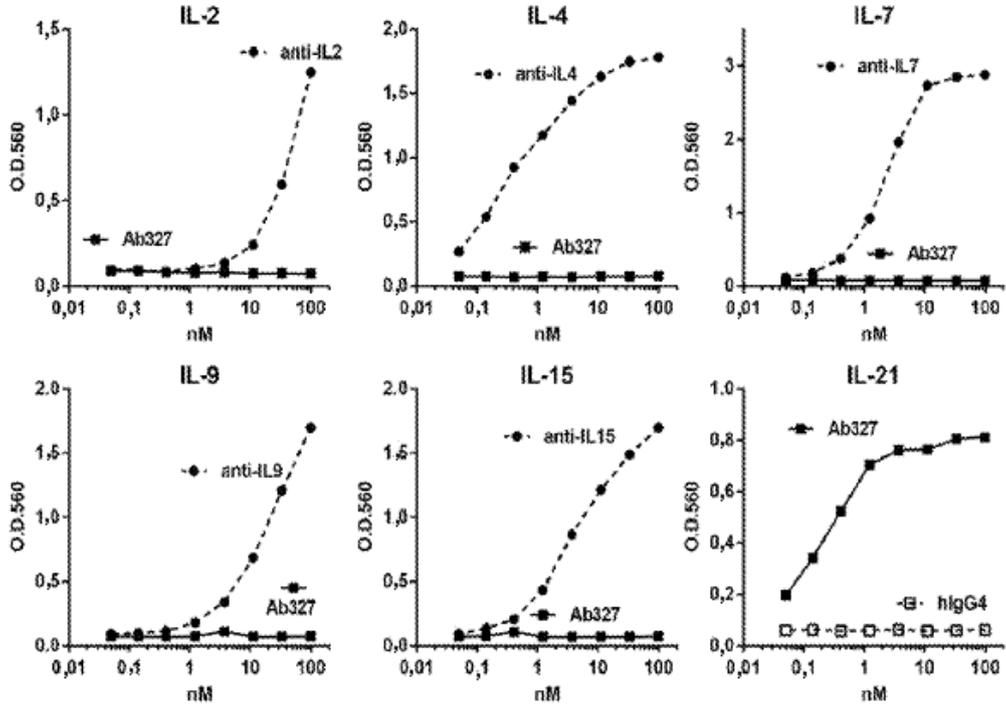


Fig. 2

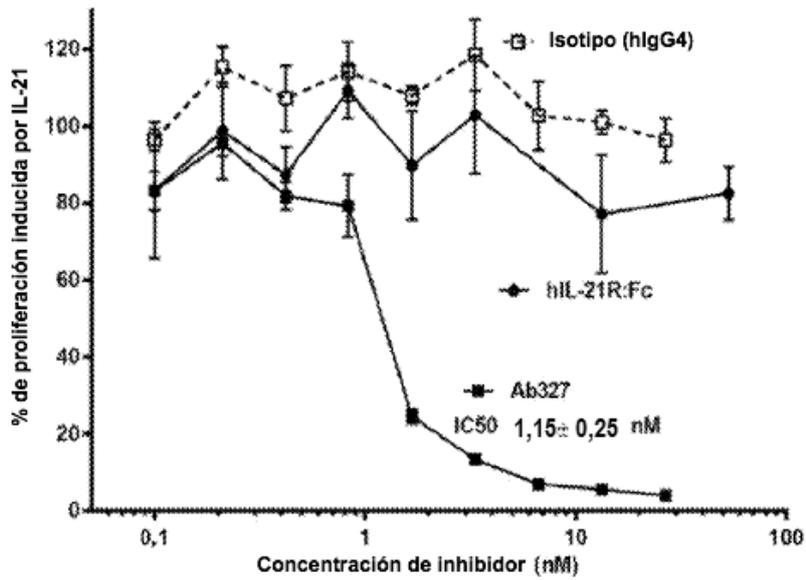


Fig. 3

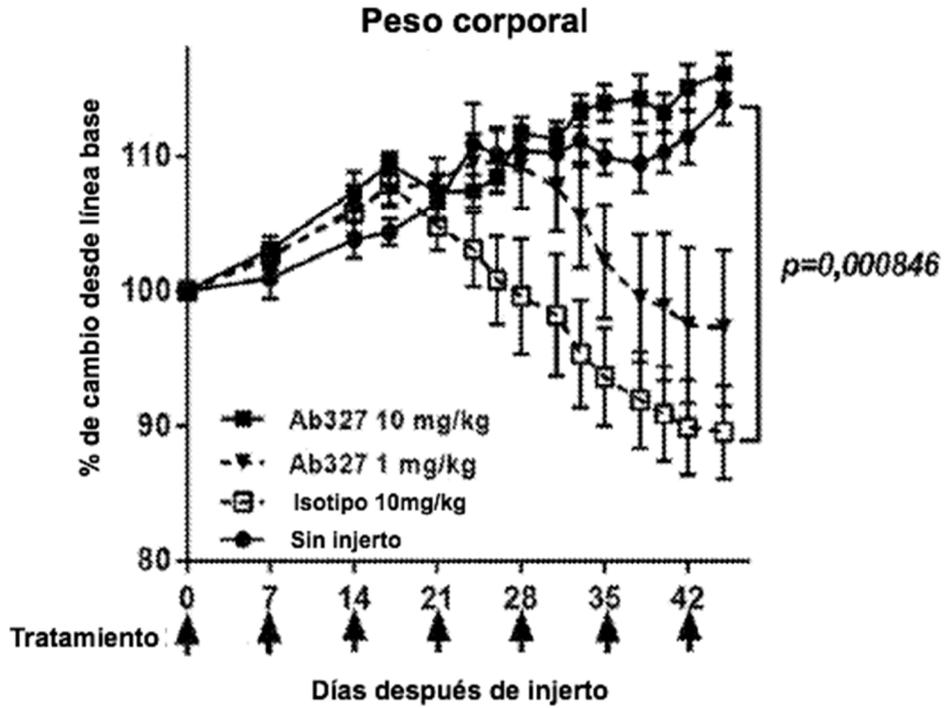


Fig. 4

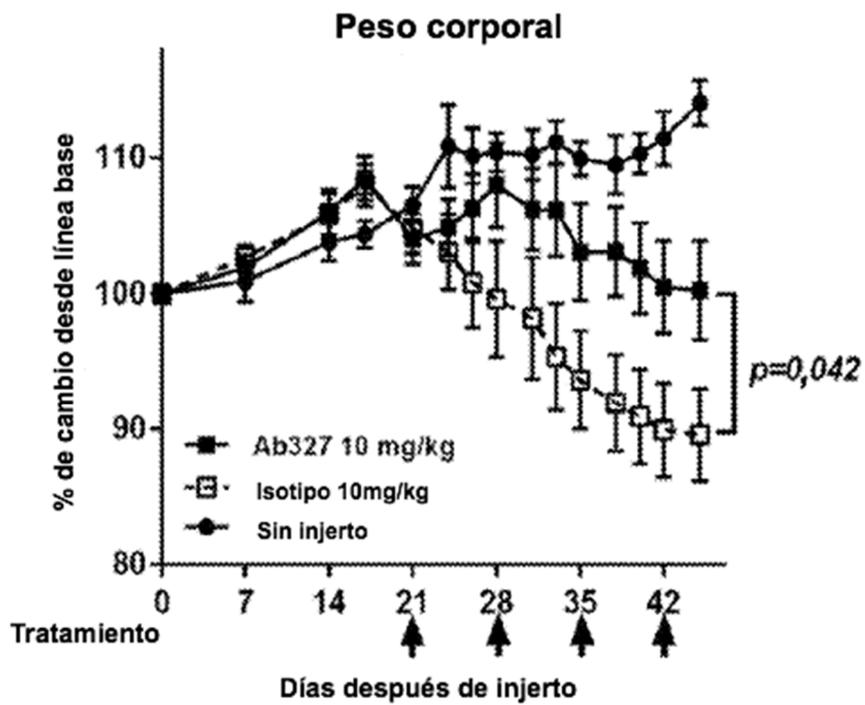


Fig. 5

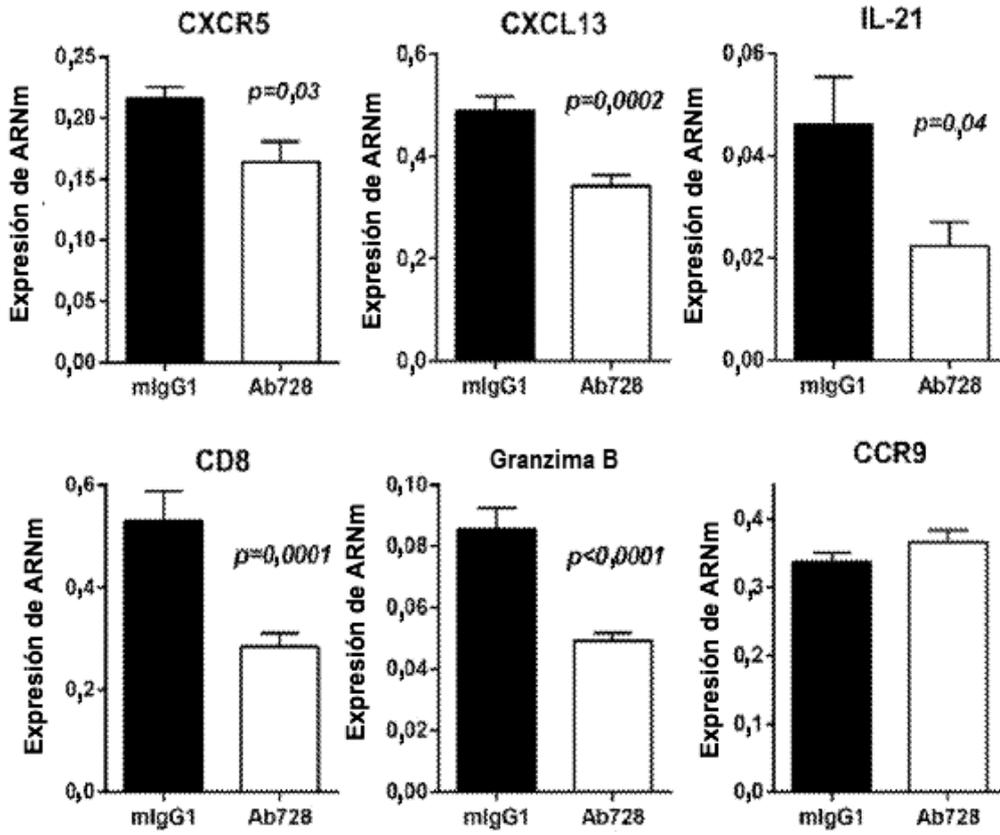


Fig. 6

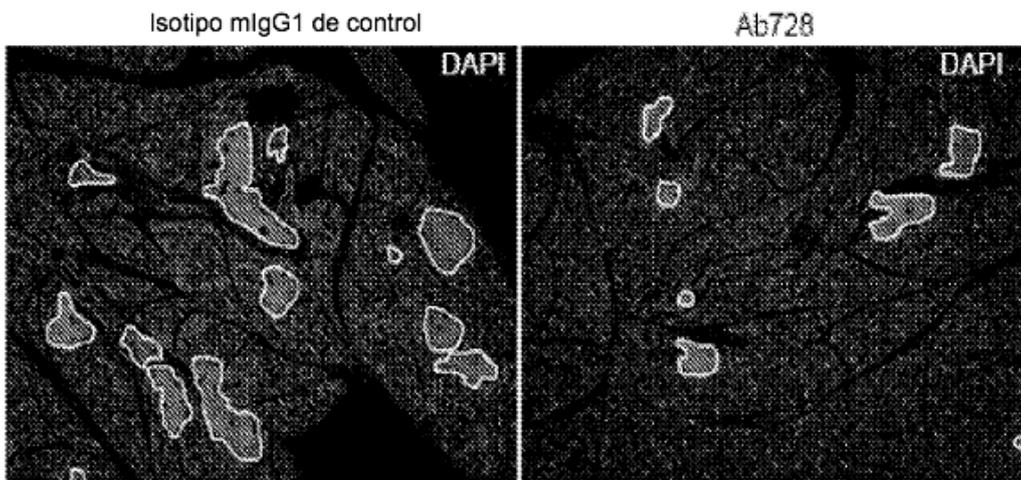


Fig. 7A

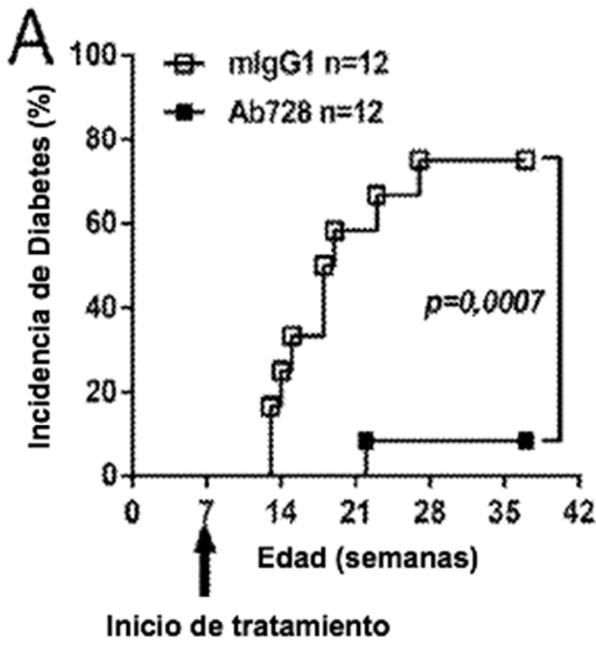


Fig. 7B

